



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07K 14/705, C12N 5/10, 15/86, A61K 48/00		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/37098
			(43) Date de publication internationale: 27 août 1998 (27.08.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/00333		(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Date de dépôt international: 20 février 1998 (20.02.98)			
(30) Données relatives à la priorité: 97/02118 21 février 1997 (21.02.97) FR		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 31-33, rue de la Fédération, F-75015 Paris (FR).			
(72) Inventeurs; et			
(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CAROSELLA, Edgardo, Delfino [FR/FR]; 23, rue George Sand, F-75016 Paris (FR). DAUSSET, Jean [FR/FR]; 9, rue Villersexel, F-75007 Paris (FR). KIRSZENBAUM, Marek [FR/FR]; 32, rue du Banquier, F-75013 Paris (FR). PAUL, Pascale [FR/FR]; 29, rue de la Grange aux Belles, F-75010 Paris (FR). ROUAS-FREISS, Nathalie [FR/FR]; 44, boulevard Arago, F-75013 Paris (FR).			
(74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).			
(54) Title: EUKARYOTIC CELLS EXPRESSING AT THEIR SURFACE AT LEAST AN HLA-G ISOFORM AND THEIR APPLICATIONS			
(54) Titre: CELLULES EUCARYOTES EXPRIMANT A LEUR SURFACE AU MOINS UNE ISOFORME D'HLA-G ET LEURS APPLICATIONS			
(57) Abstract			
<p>The invention concerns the use of a eukaryotic cell coding for at least an HLA-G isoform, to obtain an immunomodulating medicine for inhibiting the activity of killer cells, in particular NK cells and/or for inhibiting the primary allogenic response, in pathologies or situations in which the killer cells are activated or for preparing a medicine to raise the inhibiting function of the isoform(s) expressed by said cells with respect to killer cells, in particular NK cells, in pathologies where these killer cells are inhibited by the molecule of the major histocompatibility complex of I HLA-G classes. The invention also concerns eukaryotic cells expressing at their surface at least an HLA-G isoform and their applications. The invention further concerns transgenic animals specifically expressing at least an HLA-G isoform.</p>			
(57) Abrégé			
<p>Utilisation d'une cellule eucaryote codant au moins une isoforme d'HLA-G, pour l'obtention d'un médicament immunomodulant, destiné à inhiber l'activité des cellules tueuses, notamment des cellules NK et/ou à inhiber la réponse allogénique primaire, dans les pathologies ou les situations dans lesquelles lesdites cellules tueuses sont activées ou d'un médicament destiné à lever la fonction inhibitrice de la ou des isoforme(s) exprimée(s) par lesdites cellules vis-à-vis des cellules tueuses, notamment les cellules NK, dans les pathologies où ces cellules tueuses sont inhibées par la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classes I HLA-G. Cellules eucaryotes exprimant à leur surface au moins une isoforme d'HLA-G et leurs applications. Animaux transgéniques exprimant de manière spécifique au moins une isoforme d'HLA-G.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroon	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

CELLULES EUCARYOTES EXPRIMANT A LEUR SURFACE AU MOINS UNE ISOFORME D'HLA-G ET LEURS APPLICATIONS.

La présente invention est relative à des cellules eucaryotes exprimant à leur surface au moins une isoforme d'HLA-G et à leurs applications, notamment pour l'obtention d'un médicament, destiné à moduler l'activité cytolytique des cellules NK dans les pathologies où ces cellules NK sont activées ou inhibées et comme modèle d'étude, notamment dans une méthode de criblage de substances anti-tumorales.

La présente invention est également relative à des animaux transgéniques exprimant de manière spécifique au moins une isoforme d'HLA-G.

Les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), se divisent en plusieurs classes, les antigènes de classe I (HLA-A, HLA-B et HLA-C) qui présentent 3 domaines globulaires ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$), et dont le domaine $\alpha 3$ est associé à la $\beta 2$ microglobuline, les antigènes de classe II (HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR) et les antigènes de classe III (complément).

Les antigènes de classe I comprennent, outre les antigènes précités, d'autres antigènes, dits antigènes de classe I non classiques, et notamment les antigènes HLA-E, HLA-F et HLA-G ; ce dernier, en particulier, est exprimé par les trophoblastes extravilleux du placenta humain normal.

La séquence du gène HLA-G (gène HLA-6.0) a été décrite par GERAGHTY et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 9145-9149) : il comprend 4396 paires de bases et présente une organisation intron/exon homologue à celle des gènes HLA-A, -B et -C. De manière plus précise, ce gène comprend 8 exons, 7 introns et une extrémité non traduite 3' ; les 8 exons correspondent respectivement à : exon 1 : séquence signal, exon 2 : domaine extracellulaire $\alpha 1$, exon 3 : domaine extracellulaire $\alpha 2$, exon 4 : domaine extracellulaire $\alpha 3$, exon 5 : région transmembranaire, exon 6 : domaine cytoplasmique I, exon 7 : domaine cytoplasmique II (non traduit), exon 8 : domaine cytoplasmique III (non traduit) et région 3' non traduite (GERAGHTY et al., précité; ELLIS et al., J. Immunol., 1990, 144, 731-735 ; KIRSZENBAUM M. et al., *Oncogeny of hematopoiesis. Aplastic anemia* Eds. E. Gluckman, L. Coulombel, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd). Toutefois le gène HLA-G diffère des au-

tres gènes de classe I, en ce que le codon de terminaison de traduction, en phase, est localisé au niveau du deuxième codon de l'exon 6 : en conséquence, la région cytoplasmique de la protéine codée par ce gène HLA-6.0 est considérablement plus courte que celle des régions cytoplasmiques des protéines HLA-A, -B et -C.

5 Ces antigènes HLA-G sont essentiellement exprimés par les cellules cytotrophoblastiques du placenta et sont considérés comme jouant un rôle dans la protection du fœtus (absence de rejet par la mère). En outre, dans la mesure où l'antigène HLA-G est monomorphique, il peut également être impliqué dans la croissance ou la fonction des cellules placentaires (KOVATS et al., Science, 1990, 248, 220-
10 223).

D'autres recherches concernant cet antigène non classique de classe I (ISHITANI et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 3947-3951) ont montré que le transcrit primaire du gène HLA-G peut être épissé de plusieurs manières et produit au moins 3 ARNm matures distincts : le transcrit primaire d'HLA-G fournit une copie
15 complète (G1) de 1 200 pb, un fragment de 900 pb (G2) et un fragment de 600 pb (G3).

Le transcrit G1 ne comprend pas l'exon 7 et correspond à la séquence décrite par ELLIS et al. (précité), c'est-à-dire qu'il code une protéine qui comprend une séquence leader, trois domaines externes, une région transmembranaire et une
20 séquence cytoplasmique. L'ARNm G2 ne comprend pas l'exon 3, c'est-à-dire qu'il code une protéine dans laquelle les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 3$ sont directement joints ; l'ARNm G3 ne contient ni l'exon 3, ni l'exon 4, c'est-à-dire qu'il code une protéine dans laquelle le domaine $\alpha 1$ et la séquence transmembranaire sont directement joints.

L'épissage qui prévaut pour l'obtention de l'antigène HLA-G2
25 entraîne la jonction d'une adénine (A) (provenant du domaine codant $\alpha 1$) avec une séquence AC (issue du domaine codant $\alpha 3$), ce qui entraîne la création d'un codon AAC (asparagine) à la place du codon GAC (acide aspartique), rencontré au début de la séquence codant le domaine $\alpha 3$ dans HLA-G1.

L'épissage généré pour l'obtention de HLA-G3 n'entraîne pas la for-
30 mation d'un nouveau codon dans la zone d'épissage.

Les Auteurs de cet article ont également analysé les différentes protéines exprimées : les 3 ARNm sont traduits en protéine dans la lignée cellulaire .221-G.

Les Auteurs de cet article concluent à un rôle fondamental de
5 l'HLA-G dans la protection du fœtus vis-à-vis d'une réponse immune maternelle (induction d'une tolérance immune). Toutefois, il est précisé que le rôle de la protéine G3, qui ne contient pas le domaine $\alpha 3$ n'est pas établi.

Certains des Inventeurs ont récemment montré l'existence d'autres formes épissées d'ARNm d'HLA-G : le transcrit HLA-G4, qui n'inclut pas l'exon 4 ;
10 le transcrit HLA-G5, qui inclut l'intron 4, entre les exons 4 et 5, provoquant ainsi une modification du cadre de lecture, lors de la traduction de ce transcrit et en particulier l'apparition d'un codon stop, après l'acide aminé 21 de l'intron 4 ; et le transcrit HLA-G6, possédant l'intron 4, mais ayant perdu l'exon 3 (KIRSZENBAUM M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 4209-4213 ; Demande Européenne EP 0 677 582 ;
15 KIRSZENBAUM M. et al., *Human Immunol.*, 1995, 43, 237-241 ; MOREAU P. et al., *Human Immunol.* 1995, 43, 231-236) ; ils ont également montré que ces différents transcrits sont exprimés dans plusieurs types de cellules humaines fœtales et adultes, notamment dans les lymphocytes (KIRSZENBAUM M. et al., *Human Immunol.*, 1995, précité ; MOREAU P. et al., *Human Immunol.* 1995, précité).

20 Il existe donc au moins 5 ARNm HLA-G différents qui codent potentiellement 5 isoformes d'HLA-G.

Bien que le fœtus puisse être considéré comme une semiallogreffe, les cellules fœtales survivent et ne sont pas rejetées, par la mère ; il est apparu que les molécules HLA-G, exprimées à la surface des trophoblastes protègent les cellules
25 fœtales de la lyse par les cellules *natural killer* (NK) maternelles (CAROSELLA E.D. et al., *C.R. Acad. Sci.*, 318, 827-830 ; CAROSELLA E.D. et al ; *Immunol. Today*, 1996, 407-409).

Des études antérieures ont montré que l'expression des molécules HLA-G à la surface de cellules cibles permet de protéger lesdites cellules cibles de
30 l'activité lytique des cellules NK de la couche déciduale de l'endomètre maternel (CHUMBLEY G. et al., *Cell Immunol.*, 1994, 155, 312-322 ; DENIZ G. et al., *J. Immunol.*, 1994, 152, 4255-4261). Il est à noter que ces cellules cibles sont obtenues

par transfection avec des vecteurs comprenant l'ADN génomique de HLA-G, générant potentiellement tous les transcrits alternatifs.

Les cellules NK expriment des récepteurs des molécules du CMH de classe I (*killer inhibitory receptors* ou KIR ou NKIR pour récepteurs inhibiteurs NK), qui sont responsables de l'inhibition de la cytotoxicité, lorsque ces molécules HLA, agissant comme ligands, sont reconnues par ces récepteurs ; par exemple, PAZMANY L. et al. (Science, 1996, 274, 792-795) ont montré que l'expression de HLA-G protégeait de la lyse les cellules cibles LCL 721.221 (lignée cellulaire de lymphome B), transfectées par le gène HLA-G. Ces cellules sont habituellement sensibles aux cellules NK ; ils ont en outre identifié les récepteurs sur les cellules NK qui reconnaissent HLA-G, à savoir les récepteurs NKIR1 et NKIR2, appartenant à la superfamille des immunoglobulines (p58) capables de distinguer entre deux groupes dimorphiques de molécules HLA-C ; HLA-G pourrait être le ligand naturel des récepteurs des cellules NK ; certains des Inventeurs ont, en effet, montré que les cellules NK n'expriment aucun transcrit HLA-G, ce résultat confirmant que les produits d'expression du gène HLA-G jouent vraisemblablement un rôle dans l'immuno-tolérance (TEYSSIER M. et al., *Nat. Immunol.*, 1995, 14, 262-270).

Compte tenu du rôle important que peut jouer la molécule HLA-G aussi bien dans les pathologies où les cellules NK sont particulièrement actives (maladies autoimmunes, transplantations) ou sont au contraire inhibées (présence anormale de molécules HLA-G, notamment sur certaines tumeurs ou dans les infections virales), les Inventeurs, poursuivant leurs travaux ont trouvé, de manière surprenante, qu'il était possible d'exprimer à la surface cellulaire, une seule isoforme et de contrôler son expression quantitative et qualitative et donc d'en maîtriser son utilisation.

La présente invention a pour objet des cellules eucaryotes obtenues par modification génétique, caractérisées en ce qu'elles sont transfectées par un vecteur d'expression qui comprend au moins un ADNc codant une isoforme d'HLA-G, sélectionnée dans le groupe constitué par les isoformes HLAG-2, HLAG-3, HLAG-4, HLA-G5 et HLA-G6.

La présente invention a également pour objet des cellules eucaryotes obtenues par modification génétique, caractérisées en ce qu'elles sont transfectées, par

un vecteur d'expression comprenant une origine de réplication appropriée, un marqueur de sélection tel qu'un gène de résistance à un antibiotique, le promoteur viral RSV et un ADNc codant une isoforme d'HLA-G sélectionnée dans le groupe constitué par les isoformes HLA-G1, HLAG-2, HLAG-3, HLA-G4, HLA-G5 et HLA-G6.

De telles cellules expriment effectivement les différentes isoformes, sous une forme glycosylée, similaire à celle rencontrée dans les conditions biologiques.

Selon un mode de réalisation avantageux desdites cellules eucaryotes transfectées, ledit ADNc code une isoforme comportant au moins un domaine extracellulaire, notamment le domaine $\alpha 1$.

De manière surprenante, les cellules NK voient leur activité cytolytique inhibée, en présence desdites cellules eucaryotes ainsi transfectées, et ce quelle que soit l'isoforme exprimée (isoforme membranaire ou isoforme sécrétée).

Lesdites cellules eucaryotes peuvent être issues de n'importe quel animal et notamment être des cellules de mammifères, plus particulièrement des cellules humaines.

Aussi bien les cellules transfectées selon l'invention que les cellules eucaryotes transfectées par un vecteur exprimant l'isoforme HLA-G1 trouvent application :

- pour l'obtention d'un médicament immunomodulant, destiné à inhiber l'activité des cellules tueuses, notamment des cellules NK et/ou à inhiber la réponse allogénique primaire ; selon le type de cellules eucaryotes transfectées, on obtient un produit immunomodulant à action générale ou un produit immunomodulant à action spécifique, notamment adapté à la protection d'un organe greffé ; on peut citer à titre d'exemples non limitatifs les cellules hépatiques, les cellules rénales ou les cellules souches hématopoïétiques transfectées ; de manière inattendue, lesdites cellules eucaryotes protègent les cellules cibles de l'attaque de toutes les classes de cellules NK, et ce quelle que soit l'isoforme d'HLA-G exprimée ; elles sont particulièrement adaptées dans la prévention du rejet des greffes (allogreffes et xéno-greffes), dans la prévention des avortements à répétition et dans le traitement des maladies

auto-immunes, pathologies ou situations dans lesquelles les cellules tueuses sont généralement activées.

- pour l'obtention d'un médicament destiné à lever la fonction inhibitrice de la ou des isoforme(s) exprimée(s) par lesdites cellules vis-à-vis des cellules tueuses, notamment les cellules NK, dans les pathologies où ces cellules tueuses sont inhibées par la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I HLA-G ; en effet, les tumeurs solides expriment certaines isoformes d'HLA-G ; cette expression protège ces cellules cancéreuses de la lyse induite par les cellules NK ;

- pour la production de vaccins anti-tumoraux : production d'anticorps qui vont bloquer l'antigène HLA-G et réinduire ainsi l'activité des cellules NK.

- pour la production de cellules humaines aptes à être transplantées dans un organe spécifique et à protéger ce dernier de la lyse, induite par les cellules tueuses, notamment les cellules NK ;

- comme modèle d'étude de l'interaction HLA-G/cellules immuno-compétentes, notamment cellules tueuses, et plus particulièrement les cellules NK, pour trouver des effecteurs susceptibles de moduler la réponse antitumorale et d'inhiber l'expression HLA-G induite dans certains cancers, tout en conservant une expression des antigènes HLA classiques ; ceci permet leur utilisation, pour l'obtention d'un médicament destiné à lever la fonction inhibitrice de la ou des isoforme(s) exprimée(s) par lesdites cellules vis-à-vis des cellules tueuses, notamment les cellules NK, dans les pathologies, telles que les cancers, où ces cellules NK sont inhibées par la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classes I HLA-G ;

- pour la production de mammifères non humains transgéniques exprimant une isoforme spécifique HLA-G, aptes à produire des tissus exprimant ladite isoforme (donneurs de xénogreffe) et/ou aptes à créer des modèles d'étude de la régulation et de la fonction des différentes isoformes HLA-G, liés à la tolérance, dans les maladies autoimmunes et au cours des greffes.

Pour produire lesdits animaux transgéniques, notamment des souris transgéniques, on introduit au moins une copie d'un segment comprenant un ADNc

codant une isoforme d'HLA-G, associée à un promoteur convenable, dans les cellules d'un embryon de souris à un stade précoce.

La présente invention a également pour objet un récepteur purifié et isolé, caractérisé en ce qu'il est apte à lier au moins une isoforme d'HLA-G exprimée à la surface d'une cellule cible eucaryote telle que définie ci-dessus, en ce que ledit récepteur est exprimé à la surface de lignées cellulaires T qui n'expriment aucun récepteur inhibiteur KIR1, KIR2 ou CD94, ni au moins certains récepteurs membranaires spécifiques des cellules T, et en ce que la formation du complexe isoforme d'HLA-G/récepteur inhibe la lyse des cellules cibles, par lesdites lignées T.

De manière avantageuse, lesdites lignées T n'expriment pas au moins les récepteurs CD3 et $\alpha\beta$ ou n'expriment aucun récepteur membranaire spécifique des cellules T.

La lignée cellulaire leucémique T immature dénommée YT2C2 est une lignée de ce type car elle n'exprime aucun récepteur inhibiteur KIR1, KIR2 et CD94, ni les récepteurs spécifiques des cellules T, tels que les récepteurs CD3 et $\alpha\beta$.

Pour isoler ledit récepteur, il est possible :

a) soit d'incuber lesdites lignées T avec une isoforme d'HLA-G, notamment avec l'isoforme soluble HLA-G5, isoler le complexe HLA-G/récepteur formé par un traitement des lignées à la trypsine, dissocier le récepteur de la molécule HLA-G, par traitement par un agent dénaturant tel qu'un détergent, séparer le récepteur, soit en passant le mélange ainsi obtenu sur une colonne d'immunoaffinité couplée à un anticorps anti-HLA-G, et en récupérant le récepteur libre dans l'éluat, soit en soumettant ledit mélange à une électrophorèse convenable.

b) soit de cloner ledit récepteur, conformément à la méthode décrite dans Colonna M. et al., Science, 1995, 268, 405-408.

La présente invention a également pour objet un procédé d'étude de l'affinité de liaison d'une isoforme d'HLA-G pour un récepteur KIR ou un récepteur tel que défini ci-dessus (récepteur à activité NK), caractérisé en ce qu'il comprend :

- la transfection d'une cellule hôte eucaryote par un vecteur d'expression comprenant un ADNc codant une isoforme d'HLA-G,
- la culture desdites cellules hôtes, de manière à ce qu'elles expriment à leur surface ladite isoforme d'HLA-G,

- la mise en contact desdites cellules eucaryotes transfectées avec des cellules tueuses, telles que les cellules NK ou des lignées T telles que définies ci-dessus, en présence de substances activant ou inhibant l'HLA-G et/ou de substances activant ou inhibant le récepteur KIR ou le récepteur à activité NK selon l'invention et

5 - la mesure de la quantité de complexe isoforme HLA-G/récepteur.

La présente invention a également pour objet des produits contenant une cellule eucaryote exprimant au moins une isoforme d'HLA-G, telle que définie ci-dessus et un facteur de stimulation de l'expression des HLA-G, comme produits de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, dans la

10 prévention ou le traitement des pathologies ou des situations dans lesquelles les cellules tueuses sont activées, telles que les greffes, les avortements à répétition ou les maladies auto-immunes.

Conformément à l'invention, ledit facteur de stimulation est sélectionné dans le groupe constitué par les corticoïdes et les cytokines.

15 Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés dans lesquels :

- la figure 1 illustre la construction du fragment d'ADNc HLA-G2.

20 Les flèches verticales indiquent les sites des enzymes de restriction spécifiques pour la génération de l'ADNc HLA-G2, à partir de l'ADNc d'HLA-G1. Les flèches horizontales indiquent les amorces PCR (G.53, G.257, G.1225) et les lignes horizontales sans flèche indiquent les sondes spécifiques HLA-G utilisées pour l'hybridation (G.526 et G.1200).

25 - la figure 2 illustre la détection des transcrits HLA-G dans la lignée cellulaire parentale K562, les transfectants selon l'invention et la lignée cellulaire JEG-3. Les ARN sont amplifiés en utilisant les amorces spécifiques HLA-G G.257 et G.1225 ; le Southern blot est obtenu par hybridation avec des sondes marquées au phosphore³² G.1200 ou G.526. Les pistes positives (+) et négatives (-) correspondent

30 aux matrices RT⁺ et RT⁻ et le blanc est un contrôle réalisé en utilisant un mélange PCR sans matrice ADNc. Pour contrôler la quantité d'ARN dans chaque échantillon, les

résultats de l'amplification PCR obtenus avec des amorces spécifiques de la β -actine et un Southern blot sont hybridés avec une sonde marquée au phosphore P^{32} β -actine.

- la figure 3 illustre l'immunoprécipitation, le SDS-PAGE et l'analyse en Western blot des protéines de surface cellulaire marquées à la biotine. Des lysats membranaires biotinylés de cellules K562 (pistes 1 et 2), K562-pRc/RSV (pistes 3 et 4), K562-HLA-G1 (pistes 5 et 6), K562-HLA-G2 (pistes 7 et 8) et JEG-3 (pistes 9 et 10) sont immunoprécipités avec un anticorps monoclonal contrôle UHC-10 (pistes 1, 3, 5, 7 et 9) ou un anticorps monoclonal W6/32 (pistes 2, 4, 6, 8 et 10) et analysés par SDS-PAGE à 10% dans des conditions de réduction. Les marqueurs de poids moléculaire sont indiqués sur la droite.

- la figure 4 illustre l'expression des molécules HLA sur les transfectants de lignée cellulaire K562 détectées par cytofluorométrie. Les cellules sauvages K562, les cellules K562 transfectées soit avec le vecteur seul (K562 pRc/RSV), soit avec les vecteurs contenant l'ADNc codant HLA-G1 (K562-HLA-G1) ou l'ADNc codant HLA-G2 (K562-HLA-G2) et les cellules JEG-3 sont marquées par immunofluorescence indirecte avec les anticorps monoclonaux primaires suivants (profils en gras) : W6/32 anticorps monomorphe anti classe I (partie gauche de la Figure) et B1.G6 anticorps anti- β 2m humaine (partie droite de la Figure). Des contrôles sont réalisés sur les mêmes cellules marquées avec un anticorps contrôle (profils en blanc). Après lavage, les cellules sont marquées avec un anticorps F(ab)'2 d'immunoglobuline de chèvre anti-IgG de souris conjugué à la phycoérythrine. Les résultats ont été répétés au moins cinq fois.

- la figure 5 illustre l'effet de l'expression de molécules HLA-G1 et HLA-G2 sur l'activité lytique des cellules NK. Des cellules K562 transfectées soit avec le vecteur seul, soit avec le vecteur HLA-G1 ou le vecteur HLA-G2 sont utilisées comme cibles (T). Des cellules mononucléées de sang périphérique (PBMC), fraîchement isolées des différents donneurs suivants : (A) donneur 4010 (HLA-A3, -B44, -B56 et -Cw1), (B) donneur 845 (HLA-A1, -A28, -B8, -B51, et -Cw7) et (C) donneur 813 (HLA-A2, -B27, -B51, et -Cw1) sont utilisées comme cellules effectrices (E). Les résultats sont exprimés en pourcentage de lyse, enregistré en 4 heures dans un test de libération du chrome 51 (^{51}Cr). La déviation standard de la moyenne de triplicats est

en dessous de 5% et la libération spontanée n'excède jamais 10% de la libération maximale.

- la figure 6 illustre l'effet de l'expression des molécules HLA-G1 et HLA-G2 sur la lyse induite par des cellules polyclonales NK. Les cellules K562 transfectées soit avec le vecteur seul, soit avec le vecteur HLA-G1, soit avec le vecteur HLA-G2 sont utilisées comme cibles (T) pour les cellules NK (dont plus de 95% ont le phénotype suivant : CD3-, CD16+ et CD56+), isolées à partir du donneur dénommé 303 (HLA-A29, -B44, -B62 et -Cw3, -Cw5) dans un rapport E:T de 1:1, du donneur dénommé 395 (HLA-A2, -B13, -B44 et -Cw1) dans un rapport E:T de 1:1 et du donneur 481 (HLA-A3, -A26, -B27, -B35, et -Cw4, -Cw2) dans un rapport E:T de 5:1. Ces résultats sont exprimés comme pourcentage de lyse, enregistré pendant 4 heures dans un test de libération de ^{51}Cr . La déviation standard de la moyenne de triplicats est en dessous de 5% et la libération spontanée n'excède jamais 10% de la libération maximale.

- la figure 7 illustre l'effet d'un traitement à l'aide d'un anticorps monoclonal sur la résistance des cellules cibles transfectées par un vecteur HLA-G1 ou HLA-G2 à la lyse induite par les cellules NK. La cytotoxicité est établie avec les cibles indiquées et (A) les cellules mononucléées du sang périphérique du donneur 382 (HLA-A11, -A29, -B44 et -Cw5), (B) les cellules mononucléées du sang périphérique du donneur 845 (HLA-A1, -A28, -B8, -B51, et -Cw7) et (C) le clone YT2C2, comme cellules effectrices (E). Les anticorps W6/32 ou contrôle de type IgG2a sont ajoutés à l'essai à une concentration de 10 µg/ml. Les toxicités des anticorps monoclonaux sont vérifiées pour chaque test et sont toujours inférieures à 3%.

- la figure 8 illustre l'effet de l'expression HLA-G1 et HLA-G2 sur la sensibilité de la cytotoxicité du clone YT2C2. Les cellules K562 transfectées soit avec le vecteur seul, soit avec le vecteur HLA-G1 ou le vecteur HLA-G2 sont utilisées comme cellules cibles (T). Les résultats sont exprimés comme le pourcentage de lyse enregistré en 4 heures dans un test de libération du chrome 51. La déviation standard de la moyenne de triplicats est inférieure à 5% et la libération spontanée n'excède jamais 10% de la libération maximale. Cette expérience a été répétée au moins 5 fois et produit à chaque fois les mêmes résultats. L'expression des récepteurs NKIR sur le clone YT2C2 a été établie par cytofluorométrie. Les cellules YT2C2 sont marquées

par immunofluorescence indirecte avec les anticorps monoclonaux primaires suivants : EB6 (IgG1, anti-p58.1 ou NKIR1), GL183 (IgG1, anti-p58.2 ou NKIR2) et HP-3B1 (IgG2a, anti-CD94). Les contrôles sont les mêmes cellules marquées avec un anticorps non pertinent. Après lavage, les cellules sont marquées à l'aide d'un conjugué F(ab)'2 d'anticorps de chèvre anti-IgG de souris/phycoérythrine. Seulement un des quatre essais est illustré sur cette figure.

- la figure 9 illustre l'activité inhibitrice des isoformes d'HLA-G dans la réponse proliférative allogénique.

- les figures 10 et 11 illustrent l'inhibition de l'activité NK par l'isoforme HLA-G5, sous la forme d'une protéine de fusion avec la glutathion S-transférase (GST-HLA-G5). A la figure 10, des billes de Sépharose-GST-HLA-G5 sont utilisées à une concentration initiale estimée à 25 mg/ml dans un tampon PBS 1X. Les milieux de contrôle sont supplémentés avec du PBS 1X, pour remplacer l'échantillon. Les cellules mononucléées du sang périphérique du donneur 867 (HLA-A2, -A30, -B13, -B27 et Cw6), du donneur 4010 (HLA-A3, -B44, -B56 et Cw1) et du donneur 700 (HLA-A1, -A30, -B8, -B13 et Cw7) sont utilisés comme cellules effectrices (E). Les cellules K562 sont utilisées comme cellules cibles (T). Le rapport E:T=50. Les résultats sont exprimés comme précisé ci-dessus, en pourcentage de lyse, enregistré en 4 heures dans un test de libération du chrome 51 (⁵¹Cr).

- les figures 12 et 13 illustrent l'augmentation de la transcription des HLA-G, en présence de glucocorticoïdes ou de cytokines.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Production des lignées cellulaires contenant les transfectants HLA-G ; leur rôle dans la protection des cellules qui expriment ces molécules à leur surface contre la cytotoxicité des cellules NK.

A/ MATÉRIELS ET MÉTHODES

1/ Lignées cellulaires :

La lignée cellulaire érythroleucémique humaine K562 (ATCC) et la lignée cellulaire leucémique T immature (clone YT2C2 à activité NK) sont maintenues dans un milieu RPMI 1640 complémenté avec du sérum de veau fœtal à 10%,

inactivé par la chaleur, de la L-glutamine 2mM, de la gentamicine à 1 µg/ml et de la fungizone (Sigma, Saint-Quentin, France) et cultivées à 37°C dans un incubateur, humidifié à atmosphère enrichie à 5% en CO₂. Les transfectants K562 sont sélectionnés dans un milieu contenant de la généticine à 1 mg/ml (G418 sulfate, Sigma).

5 La lignée cellulaire humaine de choriocarcinome HLA-G-positive dénommée JEG-3 (ATCC) est cultivée dans un milieu DMEM (Sigma) supplémenté avec du sérum de veau foetal à 10%, inactivé à la chaleur, des antibiotiques et de la L-glutamine 2mM. Les lignées cellulaires ne contiennent pas de mycoplasmes.

2/ Les vecteurs HLA-G :

10 Pour obtenir les transfectants HLA-G1 et HLA-G2, les ADNc correspondant sont insérés dans un vecteur d'expression eucaryote dénommé pRc/RSV (Invitrogen, San Diego, CA), contenant le virus du sarcome de Rous (RSV) comme promoteur et le gène de la néomycine comme marqueur de sélection. La stratégie générale pour la construction du vecteur est illustrée à la Figure 1.

15 Brièvement, le fragment EcoRI de l'ADNc codant l'HLA-G1 d'une longueur de 1,5-kb est coupé de manière franche en utilisant un fragment Klenow de l'ADN polymérase I et soudé avec le vecteur pRc/RSV digéré par l'enzyme Hind III et déphosphorylé par la phosphatase intestinale de veau (GIBCO-BRL, Life Technologies, Eragny, France). L'orientation correcte de cette construction, dénom-

20 mée pRc/RSV-G1, est confirmée par digestion enzymatique et séquençage.

Pour obtenir les plasmides recombinants contenant la séquence codant l'HLA-G2, le fragment EcoRI d'ADNc codant la molécule HLA-G1 est inséré dans le site EcoRI du vecteur pGEX-4T-3 (Pharmacia Biotech., Orsay, France). Le fragment d'ADNc codant la molécule HLA-G2 est obtenu par amplification PCR,

25 comme décrit dans KIRSZENBAUM M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, **91**, 4209-4213, en utilisant les amorces spécifiques des HLA-G G.53 et G.1225. Le fragment obtenu est ensuite digéré par les enzymes de restriction NcoI/BsmI et inséré dans le vecteur pGEX-HLA-G1, à partir duquel le fragment NcoI/BsmI contenant la région codant le domaine α2, a été préalablement retiré (pGEX-HLA-G2). Le plasmide

30 d'expression du HLA-G2 dénommé pRc/RSV-G2 est obtenu après digestion EcoRI du vecteur pGEX-HLA-G2 ; le fragment d'ADNc est coupé de manière franche et inséré

dans le vecteur pRc/RSV digéré par l'enzyme de restriction HindIII et qui a été préalablement coupé de manière franche et déphosphorylé.

De manière identique, des vecteurs contenant les isoformes HLA-G3, HLA-G4, HLA-G5 et HLA-G6 peuvent être préparés ; les séquences codant ces
5 différentes isoformes ont été décrites dans la Demande de Brevet Européen n° 0 677 582.

3/ Lignées cellulaires contenant les transfectants HLA-G :

Les vecteurs contenant la séquence pRc/RSV-G1 ou la séquence pRc/RSV-G2 ainsi que le vecteur pRc/RSV qui sert de contrôle sont transfectés dans
10 les cellules K562 par électroporation (Bio-Rad Gene Pulsar à 250V, 960 μ F). Après deux jours de culture, les cellules sont sélectionnées avec de la généticine à 1 mg/ml dans un milieu RPMI, contenant 10% de sérum de veau foetal. Les cellules contenant les transfectants sont contrôlées par analyse par cytométrie de flux, de manière à confirmer l'expression des molécules HLA de classe I.

15 Pour obtenir un taux d'expression élevé de HLA-G dans les transfectants K562, les cellules sont isolées par tri cellulaire après immunomarquage (*fluorescence-activated cell sorting* ou FACS, Vantage-Becton Dickinson, Pont de Claix, France), à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique des HLA de classe I.

4/ Analyses RT-PCR :

20 L'ARNm total est extrait à partir de 10^7 cellules à l'aide du réactif RNA NOW (Biogentex, Inc.) conformément aux recommandations du fabricant. La qualité de l'ARN est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% dénaturant. Les ADNc sont préparés à partir de 10 μ g d'ARN total traités avec de la DNase I (Boehringer Mannheim) en utilisant une amorce oligo-(dT)₁₂₋₁₈ et la transcriptase
25 inverse M-MLV (GIBCO-BRL). Les amplifications RT-PCR sont réalisées en utilisant deux amorces spécifiques des HLA-G, la G.257 (exon 2) et la G.1225 (3'-UT), comme décrit dans KIRSZENBAUM M. et al. (1994) précité. Dans toutes les amplifications PCR, un mélange de réaction RT sans transcriptase inverse M-MLV (RT⁻) et un mélange PCR sans matrice d'ADNc (blanc), sont utilisés comme contrôles. Une
30 amplification RT-PCR additionnelle de β -actine est réalisée pour pouvoir évaluer la quantité d'ARN dans tous les échantillons. Les produits PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% et colorés à l'aide de bromure d'éthidium. La

spécificité des produits PCR est confirmée par blotting alcalin des fragments dans du NaOH 0,4 N sur des membranes de Nylon (Hybond N+, Amersham, France). L'hybridation est réalisée à l'aide des sondes G.1200 et G.526 (spécifique de l'exon 3) comme décrit dans KIRSZENBAUM M. et al, 1994 précité. Les filtres sont exposés
5 sur des films Kodak (Biomax) avec des écrans amplificateurs pendant 4 à 16 heures à -80°C.

5/ Immunoprécipitation et électrophorèse SDS-PAGE :

Les lignées cellulaires JEG-3 et K562 et les lignées transfectantes sont marquées à leur surface avec de la Biotine (Interchim), puis lavées et solubilisées
10 dans un tampon de lyse contenant 1% de Triton X100, 50 mM de Tris-HCl pH 7,4, 1mM d'EDTA, 150 mM de NaCl et 1 mM de fluorure de phénylméthylsufonyle, 10 µg/ml d'aprotinine et 10 µg/ml de leupeptine (Sigma, Saint-Quentin, France). Les lysats sont centrifugés à 13 000 rpm et préclarifiés par incubation avec une colonne Sépharose-protéine-A CL-4B (Pharmacia Biotechnology, Inc., Upsala, Suède). Les
15 lysats cellulaires préclarifiés sont divisés en deux échantillons et à chacun d'eux sont ajoutées des billes de Sépharose-protéine-A préalablement incubées, soit avec un anticorps monoclonal W6/32 de souris dirigé contre les antigènes de classe I ou un anticorps monoclonal contrôle (UPC-10, IgG2a de souris, Sigma). Après une incubation de deux heures à 4°C, les billes portant les complexes immuns sont lavées et traitées
20 avec un tampon SDS ; l'antigène lié est élué par ébullition des billes. Les protéines précipitées sont analysées par électrophorèse sur SDS-PAGE à 10%. Les gels sont transférés sur des filtres de nitrocellulose, bloqués dans un tampon PBS/Tween 20 à 0,2%/sérum albumine bovine (BSA) à 5% (incubé une nuit à 4°C) et lavés dans un tampon PBS/Tween. Les filtres sont ensuite incubés pendant 40 minutes à température
25 ambiante avec un conjugué peroxydase de raifort-streptavidine. Après un lavage extensif de la membrane, la réaction colorée est réalisée en utilisant le réactif de détection de Western blotting ECL (Amersham, France), après quoi la membrane est exposée à un film Kodak à température ambiante.

6/ Anticorps monoclonaux et analyses par cytométrie de flux :

30 Les anticorps suivants sont utilisés :

W6/32 : IgG2a, anti-chaînes α de HLA de classe I associées à la β 2-m (Sigma) ;
B1G6 : IgG2a, anti- β 2-m (Sigma) ; GL183 : IgG1, anti-p58 (Immunotech, Marseille,

France) ; EB6 : IgG1, anti-p58 (Immunotech) ; HP-3B1 : IgG2a, anti-CD94 (Immunotech) ; UCHT-1 : IgG1, anti-CD3 conjugué à du rouge quantum (Sigma) ; 3G8 : IgG1, anti-CD16 conjuguée à de la fluorescéine (Immunotech) ; et B 159 : IgG1 anti-CD56 conjuguée à de la phycoérythrine (Immunotech).

5 Pour les essais de cytométrie de flux, les cellules sont lavées dans un tampon PBS et marquées avec l'anticorps monoclonal correspondant dans du PBS/Sérum Albumine Bovine 1% pendant 30 minutes à 4°C. Après deux lavages successifs dans un tampon PBS/Sérum Albumine Bovine 1%, les cellules sont soit directement analysées dans un cytomètre de flux (FACS Vantage, Becton Dickinson), si
10 l'anticorps utilisé est conjugué à un fluorochrome, soit marquées avec un fragment F(ab')₂ d'immunoglobuline de chèvre anti- IgG de souris conjugué avec de la phycoérythrine (Immunotech) avant l'analyse FACS. Des aliquots contrôles sont marqués avec un anticorps contrôle, pour pouvoir évaluer la liaison non spécifique aux cellules cibles.

15 7/ Cellules effectrices NK :

Les cellules mononucléées du sang périphériques (PBMC) d'adultes sains volontaires (mâles et femelles âgés de 30 à 60 ans) sont obtenues par un gradient de densité Ficoll/histopaque. Les cellules NK sont isolées à partir des PBMC comme suit :

- 20 – Les cellules CD3⁺ sont éliminées en utilisant des billes revêtues d'anticorps anti-CD3 (Dynabeads Dynal, Norvège). Les billes ainsi revêtues sont mélangées avec les cellules mononucléées du sang périphérique dans un rapport 4:1 billes:cellules CD3⁺ cibles. Après incubation à 4°C pendant 30 minutes, les cellules cibles ayant formé des complexes avec les billes sont éliminées par passage dans un champ
25 magnétique approprié.
- La fraction dépourvue de cellules CD3⁺ est alors marquée avec un anticorps monoclonal anti-CD56 conjugué à de la phycoérythrine, pour sélectionner les cellules CD56⁺ par tri cellulaire à l'aide d'un cytomètre de flux (FACS).
- Pour contrôler le phénotype des cellules triées (CD56⁺), un échantillon de cellules
30 est immédiatement marqué avec soit des anticorps monoclonaux anti-CD16 conjugués avec de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), soit avec un anticorps monoclonal anti-CD3 conjugué avec du rouge quantum, suivi par une analyse fluo-

cente. La population CD56⁺ obtenue est viable (> 95%) et présente un phénotype qui correspond aux cellules NK (plus de 90% des cellules NK sont CD3⁺, CD16⁺, CD56⁺).

9/ Essais de cytotoxicité :

5 L'activité cytolytique des cellules mononucléées du sang périphérique, des cellules NK et des cellules YT2C2 (cellules effectrices ou E) à l'encontre des transfectants HLA-G (cellules cibles ou T) est estimée à l'aide de tests de libération pendant 4 heures du chrome 51, dans lesquels les cellules effectrices sont mélangées avec 5.10³ de cellules cibles marquées au chrome 51 (100 µCi de ⁵¹Cr-chromate de sodium, Amersham, UK), dans différents rapports E/T, dans des plaques de microtitration dont le fond est en forme de U.

Après 4 heures à 37°C dans un incubateur humidifié contenant 5% de CO₂, 100 µl de surnageant sont prélevés pour un comptage par scintillation en phase liquide (Wallac 1450 Microbeta, Pharmacia, France). Le pourcentage de lyse
15 spécifique est calculé comme suit :

pourcentage de lyse spécifique = [cpm dans le puits expérimental - cpm de libération spontanée]/(cpm de libération maximale - cpm de libération spontanée) x 100.

La libération spontanée est déterminée par incubation des cellules cibles (T) marquées avec le milieu. La libération maximale est déterminée par solubilisation des cellules cibles dans de l'HCl 0,1 M. Dans toutes les expériences, la libération spontanée est inférieure à 10% par rapport à la libération maximale. Les résultats sont présentés comme des moyennes de trois échantillons. Dans les expériences dans lesquelles les anticorps monoclonaux sont utilisés pour bloquer l'interaction HLA-G-NK, les cellules cibles sont incubées avec l'anticorps monoclonal correspondant, puis
25 lavées et incubées avec un anticorps F(ab')₂ de chèvre anti-souris (Jackson Immunoresearch, USA) pour éviter la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) par interaction des récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines, exprimés sur les cellules NK avec le premier anticorps utilisé. Les toxicités des anticorps monoclonaux sont également vérifiées dans chaque essai et sont toujours inférieures à 3%.
30

B/ RESULTATS :**1/ Production de transfectants stables exprimant la molécule HLA-G1 ou la molécule HLA-G2 :**

L'analyse des séquences d'ADNc d'HLA-G1 et d'HLA-G2 transfec-
5 tées démontre que l'ADNc d'HLA-G1 ne contient pas les deux codons GAC cor-
respondant aux positions en acides aminés 247 et 248 (ELLIS et al., J. Immunol, 1990,
144, 731-735), mais seulement un seul codon GAC. correspondant à la position en
acides aminés 247 (PAZMANY L. et al., Science, 1996, 274, 792-795). La séquence
d'ADNc codant l'HLA-G2, obtenue par amplification RT-PCR à l'aide des sondes
10 G.53 et G.1225, présente une jonction entre les exons 2 et 4, en raison de l'absence de
l'exon 3 dans cette forme d'ARNm épissée.

La caractérisation des transfectants est réalisée par une analyse en
Southern blot des produits de la RT-PCR obtenus en utilisant les amorces G.257 et
G.1225 avec la lignée cellulaire parentale K562, les transfectants et les cellules JEG-3.
15 Les résultats sont illustrés à la Figure 2. L'hybridation des produits de la RT-PCR
obtenus, avec la sonde G.1200, révèle une bande de 0,98 kb pour le transfectant K562-
HLA-G1 correspondant à l'ARNm d'HLA-G1 et une bande de 0,71 kb correspondant
à la forme épissée alternative, qui ne comprend pas l'exon 3 (KIRSZENBAUM M. et
al., Hum. Immunol., 1995, 43, 237-241). Avec les cellules JEG-3, trois bandes sont
20 observées à 0,98 kb (HLA-G1), 0,7 kb (HLA-G2 et HLA-G4) et 0,43 kb (HLA-G3)
(MOREAU P. et al., Hum. Immunol., 1997, 52, 41-46). Par contraste, aucune bande
HLA-G n'est détectée dans la lignée cellulaire parentale K562 ou dans la lignée trans-
fectante contrôle K562-pRc/RSV. L'hybridation des mêmes produits de la RT-PCR
avec la sonde spécifique de l'exon 3 G.526 révèle une seule bande dans les cellules
25 transfectées HLA-G1 tandis qu'aucune hybridation n'est observée dans les transfec-
tants HLA-G2, en raison de l'absence de l'exon 3 dans la forme HLA-G2 (Figure 2).
L'amplification RT-PCR du gène de la β -actine, constitutivement exprimée, démontre
que l'absence de bandes HLA-G dans les contrôles K562 n'est pas due à l'absence
d'ARN (Figure 2).

2/ Immunoprécipitation and analyse SDS-PAGE des protéines de surface marquées :

L'immunoprécipitation des protéines HLA avec l'anticorps monoclonal W6/32 est réalisée, afin d'établir si les transfections permettent d'obtenir une expression spécifique des protéines HLA-G à la surface. Comme illustré à la Figure 3, le Western blot correspondant révèle que l'anticorps monoclonal W6/32 immunoprécipite une molécule de 39-kDa dans les cellules K562 qui expriment la protéine HLA-G1 (piste 6) et dans les cellules JEG-3 (piste 10). Pour les transfectants HLA-G2, l'immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps W6/32 montre une bande correspondant à la taille de la protéine G2. Aucune molécule du système HLA (molécule HLA classique de classe I, HLA-G1 ou HLA-G2) n'est trouvée ni dans les cellules parentales K562, ni dans les cellules contrôles K562 pRc-RSV.

3/ Analyse par cytométrie de flux des transfectants HLA-G :

Pour déterminer le taux d'expression d'HLA-G à la surface des cellules, l'analyse des profils en cytométrie de flux des différentes cellules est réalisée ; les résultats sont illustrés à la Figure 4 et concernent les différentes lignées étudiées : la lignée cellulaire parentale K562, la lignée contrôle comprenant le plasmide pRc/RSV, les transfectants HLA-G1 et HLA-G2 ainsi que la lignée cellulaire JEG-3 de choriocarcinome positive pour l'expression du HLA-G. Les résultats observés montrent que la lignée cellulaire parentale K562 n'exprime aucun taux détectable de molécule de surface HLA de classe I (estimation à l'aide de l'anticorps pan—HLA de classe I W6/32 et à l'aide de l'anticorps anti- β 2m B1G6). Aucune molécule HLA de classe I n'est détectée dans la lignée cellulaire K562 transfectée avec le vecteur vide pRc/RSV. Le transfectant HLA-G1 est marqué par les anticorps W6/32 et B1G6 à peu près de la même manière que ce qui est obtenu avec les cellules JEG-3. Le transfectant HLA-G2 est également marqué par l'anticorps W6/32 ainsi que l'anticorps B1G6. Ce résultat montre que l'isoforme HLA-G2 liée à la membrane est bien présente à la surface des cellules, associée avec la β 2-microglobuline, de la même manière que les molécules HLA de classe I classiques.

4/ Résistance des transfectants HLA-G1 et HLA-G2 à la cytolyse par les cellules NK :

Les transfectants HLA-G1 et HLA-G2 sont testés parallèlement à la lignée parentale correspondante pour leur sensibilité aux cellules NK. 20 expériences ont été effectuées, chacune enregistrée avec des cellules mononucléées de différents donneurs. La Figure 5 montre que l'activité lytique des cellules NK, présentes dans les cellules mononucléées du sang périphérique isolé à partir de trois adultes donneurs sains, est inhibée aussi bien par les transfectants K562 HLA-G1 que par les transfectants K562 HLA-G2, tandis que la lignée cellulaire contrôle K562 pRC/RSV reste sensible à l'activité lytique des cellules NK.

Bien que le taux absolu de lyse varie d'un donneur à l'autre, comme illustré à la Figure 5 pour les donneurs désignés 4010, 845 et 813 qui présentent respectivement des taux de lyse élevés, moyens et bas, la sensibilité des cellules exprimant la molécule HLA-G1 et la molécule HLA-G2 est réduite d'au moins 70%. Ces résultats sont confirmés lorsque l'on utilise des cellules polyclonales NK CD3⁺, CD16⁺, CD56⁺, obtenues à partir de cellules mononucléées de sang périphérique de trois autres donneurs comme cellules effectrices (Figure 6). En outre, aucune différence n'est observée entre les donneurs mâles et femelles.

Afin de montrer que l'inhibition de l'activité lytique des cellules NK est due effectivement à la présence des molécules HLA-G1 et HLA-G2 à la surface des cellules cibles, des tests de cytotoxicité sont réalisés en présence de cellules cibles préincubées soit avec l'anticorps W6/32 qui reconnaît les molécules HLA-G1 et HLA-G2, soit à l'aide d'un anticorps contrôle. L'addition d'anticorps monoclonal W6/32 lève l'inhibition de l'activité des cellules NK, due à la présence des molécules HLA-G1 et HLA-G2 et, par conséquent, restaure l'activité lytique des cellules NK sur les cellules cibles transfectées (Figures 7a et 7b). Dans la mesure où le mécanisme de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) pourrait être impliqué dans cette réaction par l'interaction avec les récepteurs au fragment Fc des cellules NK, le fragment Fc de l'anticorps W6/32 est bloqué par un fragment F(ab')₂ d'anticorps de chèvre anti-IgG de souris.

5/ Inhibition de la lyse induite par le clone YT2C2 à activité NK, par les transfectants HLA-G1 et HLA-G2 :

Le clone YT2C2 correspondant à des cellules T immatures leucémiques est utilisé comme effecteur contre les transfectants HLA-G. La Figure 8 montre qu'aussi bien les transfectants HLA-G1 que les transfectants HLA-G2 abolissent la lyse induite par le clone YT2C2, tandis que les lignées cellulaires contrôles ne le font pas. Cependant, contrairement à ce qui est observé avec les cellules mononucléées du sang périphérique, l'inhibition de la lyse induite par le clone YT2C2 n'est pas levée par l'utilisation de cellules cibles transfectées traitées par l'anticorps monoclonal W6/32 (Figure 7c), suggérant que l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal sur la molécule HLA-G n'est pas impliqué dans la reconnaissance de la molécule HLA-G par le récepteur qui est présent sur les cellules YT2C2.

Une analyse par immunofluorescence indirecte est réalisée, de manière à vérifier le phénotype des cellules YT2C2. Pour ce faire, les anticorps monoclonaux EB6 et GL183, qui reconnaissent respectivement les récepteurs NKIR1 et NKIR2, exprimés à la surface de sous-groupes de cellules NK, ainsi que l'anticorps HP-3B1, qui reconnaît le récepteur CD94 et qui est exprimé sur la plupart des cellules NK, ont été utilisés. Ces récepteurs sont impliqués dans la reconnaissance des molécules HLA-A, -B ou -C par les cellules NK (COLONNA et al., Science, 1995, **268**; 405-408 et MORETTA et al., J. Exp. Med, 1994, **180**, 545-555). La Figure 8 montre que les cellules YT2C2 présentent le phénotype négatif suivant : EB6⁻, GL183⁻ et HP3B1⁻. Ces anticorps monoclonaux ont été préalablement testés par immunofluorescence indirecte et marquent positivement 3 à 10% des cellules mononucléées du sang périphérique des donneurs adultes sains. Ces différents résultats montrent que, en plus des récepteurs dénommés NKIR1 et NKIR2, qui ont été récemment décrits comme reconnaissant HLA-G (PAZMANY et al. (1996) précité), le clone YT2C2 exprime un nouveau récepteur capable de lier les molécules HLA-G et d'induire une protection contre la lyse par les cellules YT2C2.

L'ensemble des résultats montre que les antigènes HLA-G jouent un rôle dans la protection des cellules qui expriment ces molécules à leur surface contre la cytotoxicité induite par les cellules NK. Contrairement aux travaux de l'art antérieur (CHUMBLEY et al., Cell Immunol., 1994, **155**, 312-322 ; DENIZ et al., J. Immunol.,

1994, **152**, 4255-4261 et PAZMANY L. et al. (1996) précité), dans lesquels il a été proposé de transfecter l'ADN génomique codant la molécule HLA-G dans une cellule cible, pour étudier ses effets sur l'activité lytique de clone NK, les Inventeurs ont trouvé qu'en évaluant séparément les isoformes HLA-G1 et HLA-G2, dans des conditions physiologiques face à des cellules NK polyclonales obtenues à partir de donneurs sains adultes, il était possible de manière surprenante : (i) d'exprimer les molécules HLA-G1 et HLA-G2, à la surface des cellules cibles et (ii) de montrer que de telles cellules cibles ainsi modifiées étaient capables d'inhiber l'activité lytique desdites cellules NK.

Le Tableau I ci-après démontre qu'aussi bien l'isoforme HLA-G1 et que l'isoforme HLA-G2 liées à la membrane cellulaire inhibent fortement la lyse induite par les cellules NK.

Tableau I

	transcrit mRNA		expression membranaires des HLA de classe I	Résistance à la lyse NK
Lignée cellulaire	HLA-G1	HLA-G2	W6/32	
Non transfectée				
K562	-	-	-	-
Transfectées				
K562-pRc/RSV	-	-	-	-
K562-HLA-G1	+	-	+	+
K562-HLA-G2	-	+	+	+

Cette inhibition est levée lorsque les cellules transfectées qui expriment la molécule HLA-G1 ou la molécule HLA-G2 sont incubées avec l'anticorps monoclonal pan-classe I, indiquant que l'inhibition de la lyse induite par les cellules NK est due à la présence des molécules HLA-G à la surface des cellules cibles transfectées K562 (Figure 7). Le fait que l'activité lytique NK soit inhibée chez tous les donneurs testés par les cellules cibles HLA-G positives, confirme que la molécule

HLA-G pourrait être le ligand public du récepteur inhibiteur NK présent chez tous les individus (NKIR) et montre l'intérêt de l'obtention de cellules présentant un taux important et prédictible d'expression de molécules HLA-G.

De manière surprenante, il ressort de ces résultats que le domaine $\alpha 1$ commun à ces deux isoformes devrait être considéré comme jouant un rôle important dans la protection contre les cellules NK. Ceci peut être soutenu par le fait que les séquences en amino acides des molécules HLA de classe I nécessaires pour l'interaction avec le récepteur KIR sont localisées dans le domaine $\alpha 1$ (COLONNA et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1992, **89**, 7983-7985 et MANDELBOIM et al., J. Exp. Med., 1996, **184**, 913-922). L'analyse séquentielle montre que le domaine $\alpha 1$ des molécules HLA-G présente des amino acides qui ont été antérieurement décrits comme induisant une résistance contre la cytolysé induite par les cellules NK dans les allèles protecteurs HLA-A, HLA-B et HLA-C (PAZMANY et al. précité). De manière surprenante, les Inventeurs ont trouvé maintenant que la molécule HLA-G partage des caractéristiques structurales avec les allèles protecteurs HLA-A3, A11, Aw68, Aw69, B7 et B27. En particulier, la position 74 dans le domaine $\alpha 1$ de l'HLA-G est occupé par un résidu Asp, associé avec l'induction d'une résistance aux cellules NK.

En outre, les Inventeurs ont trouvé, également de manière surprenante, que les cellules T leucémiques YT2C2 n'induisaient plus de lyse en présence de transfectants exprimant la molécule HLA-G1 ou la molécule HLA-G2, bien qu'aucun des récepteurs KIR capables de lier l'HLA-G (récepteur p58.1, récepteur p58.2 et CD94) ne soient présents sur les cellules YT2C2 (Figure 8). Ces résultats suggèrent qu'un nouveau récepteur distinct de ceux déjà décrits est impliqué dans la reconnaissance des molécules HLA-G1 et HLA-G2.

EXEMPLE 2 : Mise en évidence de l'activité inhibitrice des isoformes d'HLA-G dans la réponse proliférative allogénique

On réalise une culture mixte de cellules mononucléées provenant du sang périphérique de deux donneurs volontaires présentant des antigènes HLA de classe II différents. Les cellules d'un donneur dites stimulantes, ont été irradiées à 3000 rads pour éviter leur prolifération. Seules les cellules répondantes de l'autre individu peuvent proliférer.

On introduit dans ces cultures, soit des cellules K562 contenant le plasmide pRc/RSV, à titre de contrôle (pas d'expression d'antigène du CMH), soit des cellules K562 transfectées et exprimant à leur surface, une isoforme d'HLA-G, par exemple l'isoforme HLA-G1 (insertion du plasmide pRc/RSV-G1). Les cellules K562
5 ont été irradiées, afin d'éviter toute prolifération.

La figure 9 illustre les résultats obtenus : on observe, sur quatre donneurs différents, une inhibition de la réponse proliférative allogénique, de l'ordre de 50 à 67 %.

EXEMPLE 3 : Inhibition de l'activité NK par la protéine HLA-G5

10 Exprimée par une cellule eucaryote selon l'invention ou directement injectée, la protéine HLA-G5 inhibe, comme les autres isoformes d'HLA-G, l'activité cytolytique des cellules NK.

Cette inhibition est dose-dépendante, comme le montrent les figures 10 et 11, qui sont le résultat d'essais réalisés avec une protéine de fusion GST-HLA-G5 exprimée chez *E. coli*. Cette protéine de fusion est purifiée sur une colonne glutathion-Sépharose (Pharmacia Biotech) ou par chromatographie d'affinité avec des anticorps anti-HLA ou des anticorps anti-GST, après extraction à partir des cultures bactériennes (centrifugation, récupération du culot dans un tampon STE, lyse des cellules avec du N-laurylsarcosine à 1,5 %, clarification du lysat par centrifugation et
20 solubilisation du surnageant par du triton X-100 à 2 %).

Les essais de cytotoxicité sont réalisés comme précisé ci-dessus, en utilisant des cellules K562, sensibles aux cellules NK, comme témoin positif.

14 expériences, réalisées sur des cellules mononucléées de différents donneurs sont réalisées en présence de GST-HLA-G5 ou de Sépharose-GST-HLA-G5.

25 La figure 10 montre que l'activité lytique des PBMC, isolées de trois donneurs sains adultes, est inhibée par des billes de Sépharose-GST-HLA-G5 ; la figure 11 confirme que la protéine soluble présente la même activité inhibitrice sur la lyse induite par les cellules NK, que les autres isoformes.

EXEMPLE 4 : Facteurs intervenant dans la stimulation de la transcription des différentes isoformes d'HLA-G.

Test de protection de la RNase

A/ MATERIEL ET METHODE

5 - Radiosondes :

des sondes ARNc simple-brins radiomarquées sont synthétisées à l'aide du kit de transcription MAXIScript® (Ambion) en présence de T7 ARN polymérase et de 5 µl de (α -³²P) CTP (Amersham), conformément aux indications du fabricant.

10 Une matrice cyclophiline est fournie par le fabricant (Ambion). Une matrice HLA-G est obtenue par amplification en chaîne (PCR) d'un fragment d'HLA-G génomique correspondant à une partie de la région non traduite (région 3' UT). Les amorces utilisées sont les suivantes :

. amorce sens (G.1089F) : 5'-CCCTTTGTGACTTCAAGAAC

15 . amorce anti-sens (T7G.1250R) : 5'-GGATCCTAATACGACT
CACTATAGGGAGGTTATAGCTCAGTGGCCCAC.

Cette amorce contient une séquence qui permet de générer un promoteur T7 pendant la PCR (partie en gras).

20 Les sondes sont purifiées par électrophorèse sur un gel acrylamide à 6 % + urée 8 M environ 1 h à 200 V.

Après l'électrophorèse, le gel est exposé à un film sensible aux rayons X.

La zone du gel contenant le transcrit marqué complet est immergée dans 350 µl de tampon d'élution de sonde (kit Ambion).

25 - Méthode :

La protection des transcrits HLA-G est réalisée conformément au kit HybSpeed® RPA kit (Ambion), conformément aux recommandations du fabricant.

30 5 µg d'ARN total sont isolés avec le réactif RNA NOW (Ozyme) selon les recommandations du fabricant ; 5.10⁵ cpm de ribosonde HLA-G et 5.10⁵ cpm de ribosonde cyclophiline sont hybridés pendant 10 min dans un tampon d'hybridation HybSpeed®.

Un mélange d'ARNase A/T à une concentration finale de 1/100ème est ajouté pendant 30 secondes. Ces fragments protégés et radiomarqués sont précipités et séparés sur un gel acrylamide à 5 % : gel bis-acrylamide (19:1) (100 V).

Le gel est séché et exposé (Biorad) pour quantifier le signal HLA-G.

5 Les valeurs sont comparées aux signaux obtenus avec la cyclophiline.

B/RESULTATS

Différentes hormones et cytokines augmentent la transcription de la molécule HLA-G. Les figures 12 et 13 illustrent les résultats obtenus après incubation, pendant 72 heures, de trophoblastes ou de cellules eucaryotes exprimant au moins une isoforme d'HLA-G avec les différents facteurs suivants : interleukine 10, interleukine 10, 10
1β, interféron γ, TGF-β, EGF, prolactine, β oestradiol, hydrocortisone et dexaméthasone.

Ces figures illustrent l'augmentation de la transcription d'ARNm, par la technique de RPP.
15

Ces figures 12 et 13 montrent en particulier que le rapport d'augmentation, vis-à-vis des trophoblastes, en présence de milieux de culture et sans aucune stimulation, est de 2x à 7,3x, particulièrement pour IL 10, IL 1β, TGF β et les glucocorticoïdes.

20 Ces résultats montrent en particulier l'intérêt des produits selon l'invention dans la prévention des avortements spontanés à répétition.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du
25 cadre, ni de la portée de la présente invention.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
(B) RUE: 31-33 rue de la Federation
(C) VILLE: PARIS
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 75015

(A) NOM: CAROSELLA Edgardo Delfino
(B) RUE: 23 rue George Sand
(C) VILLE: PARIS
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 75016

(A) NOM: DAUSSET Jean
(B) RUE: 9 rue de Villersexel
(C) VILLE: PARIS
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 75007

(A) NOM: KIRSZENBAUM Marek
(B) RUE: 32 rue du Banquier
(C) VILLE: PARIS
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 75013

(A) NOM: PAUL Pascale
(B) RUE: 29 rue de la Grange aux Belles
(C) VILLE: PARIS
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 75010

(A) NOM: ROUAS-FREISS Nathalie
(B) RUE: 44 Boulevard Arago
(C) VILLE: PARIS
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 75013

(ii) TITRE DE L' INVENTION: CELLULES EUCARYOTES EXPRIMANT A LEUR SURFACE AU MOINS UNE ISOFORME D'HLA-G ET LEURS APPLICATIONS.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 2

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(v) DONNEES DE LA DEMANDE ACTUELLE:

NUMERO DE LA DEMANDE: FR 97 02118

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 20 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

27

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
 - (A) DESCRIPTION: /desc = "Amorce"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

CCCTTTGTGA CTTCAAGAAC

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 48 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
 - (A) DESCRIPTION: /desc = "Amorce"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

GGATCCTAAT ACGACTCACT ATAGGGAGGT TATAGCTCAG TGGCCCAC

48

REVENDICATIONS

1°) Utilisation d'une cellule eucaryote codant au moins une isoforme d'HLA-G, pour l'obtention d'un médicament immunomodulant, destiné à inhiber l'activité des cellules tueuses, notamment des cellules NK et/ou à inhiber la réponse allogénique primaire, dans les pathologies ou les situations dans lesquelles lesdites cellules tueuses sont activées.

2°) Utilisation d'une cellule eucaryote codant au moins une isoforme d'HLA-G, pour l'obtention d'un médicament destiné à lever la fonction inhibitrice de la ou des isoforme(s) exprimée(s) par lesdites cellules vis-à-vis des cellules tueuses, notamment les cellules NK, dans les pathologies où ces cellules tueuses sont inhibées par la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classes I HLA-G.

3°) Produits contenant une cellule eucaryote exprimant au moins une isoforme d'HLA-G et un facteur de stimulation de l'expression des HLA-G, comme produits de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, dans la prévention ou le traitement des pathologies ou des situations dans lesquelles les cellules tueuses sont activées, telles que les greffes, les avortements à répétition ou les maladies auto-immunes.

4°) Produits selon la revendication 3, caractérisés en ce que ledit facteur de stimulation est sélectionné dans le groupe constitué par les corticoïdes et les cytokines.

5°) Utilisation d'une cellule eucaryote codant au moins une isoforme d'HLA-G, comme modèle d'étude de l'interaction HLA-G/cellules immunocompétentes, notamment les cellules tueuses.

6°) Utilisation d'une cellule eucaryote codant au moins une isoforme d'HLA-G, pour l'obtention d'une composition destinée à la transplantation desdites cellules dans un organe cible.

7°) Mammifères transgéniques non humains, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par l'insertion d'un vecteur d'expression, constitué successivement d'une origine de répllication, appropriée, d'un marqueur de sélection tel qu'un gène de résistance à un antibiotique, du promoteur viral RSV et d'au moins une copie d'un segment comprenant un ADNc codant une isoforme d'HLA-G, dans les cellules d'un embryon de mammifère à un stade précoce.

8°) Utilisation des animaux transgéniques exprimant la molécule HLA-G à la surface de leurs cellules, pour la préparation d'organes aptes à être greffés.

9°) Récepteur purifié et isolé, caractérisé en ce qu'il est apte à lier au moins une isoforme d'HLA-G exprimée à la surface d'une cellule cible eucaryote, en ce que ledit récepteur est exprimé à la surface de lignées cellulaires T qui n'expriment aucun récepteur inhibiteur KIR1, KIR2 ou CD94, ni au moins certains récepteurs membranaires spécifiques des cellules T et en ce que la formation du complexe isoforme d'HLA-G/récepteur inhibe la lyse des cellules cibles par lesdites lignées.

10°) Procédé d'étude de l'affinité de liaison d'une isoforme d'HLA-G pour un récepteur NK ou un récepteur à activité NK selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la transfection d'une cellule hôte eucaryote par un vecteur d'expression comprenant un ADNc codant une isoforme d'HLA-G,

- la culture desdites cellules hôtes, de manière à ce qu'elles expriment à leur surface ladite isoforme d'HLA-G,

- la mise en contact desdites cellules eucaryotes transfectées avec des cellules tueuses, telles que des cellules NK ou des lignées T qui n'expriment aucun récepteur inhibiteur KIR1, KIR2 ou CD94, ni au moins certains récepteurs membranaires spécifiques des cellules T, en présence de substances activant ou inhibant l'HLA-G et/ou de substances activant ou inhibant le récepteur NK ou le récepteur à activité NK et

- la mesure de la quantité de complexe isoforme HLA-G/récepteur.

11°) Vaccin anti-tumoral, caractérisé en ce qu'il comprend des cellules eucaryotes exprimant au moins une isoforme d'HLA-G.

12°) Cellules eucaryotes obtenues par modification génétique, caractérisées en ce qu'elles sont transfectées par un vecteur d'expression qui comprend au moins un ADNc codant une isoforme d'HLA-G, sélectionnée dans le groupe constitué par les isoformes HLAG-2, HLAG-3, HLA-G4, HLA-G5 et HLA-G6.

13°) Cellules eucaryotes obtenues par modification génétique, caractérisées en ce qu'elles sont transfectées, par un vecteur d'expression comprenant une origine de répllication appropriée, un marqueur de sélection tel qu'un gène de résis-

tance à un antibiotique, le promoteur viral RSV et un ADNc codant une isoforme d'HLA-G sélectionnée dans le groupe constitué par les isoformes HLA-G1, HLAG-2, HLAG-3, HLA-G4, HLA-G5 et HLA-G6.

14°) Cellules eucaryotes selon la revendication 12 ou la
5 revendication 13, caractérisées en ce que ledit ADNc code une isoforme comportant au moins un domaine extracellulaire, notamment le domaine $\alpha 1$.

15°) Utilisation d'un vecteur qui comprend un ADNc codant une isoforme d'HLA-G tel que défini à la revendication 13, pour l'obtention d'animaux transgéniques.

10 16°) Tissus ou organes de mammifères, caractérisés en ce qu'ils incluent des cellules eucaryotes selon l'une quelconque des revendications 12 à 14.

1/13

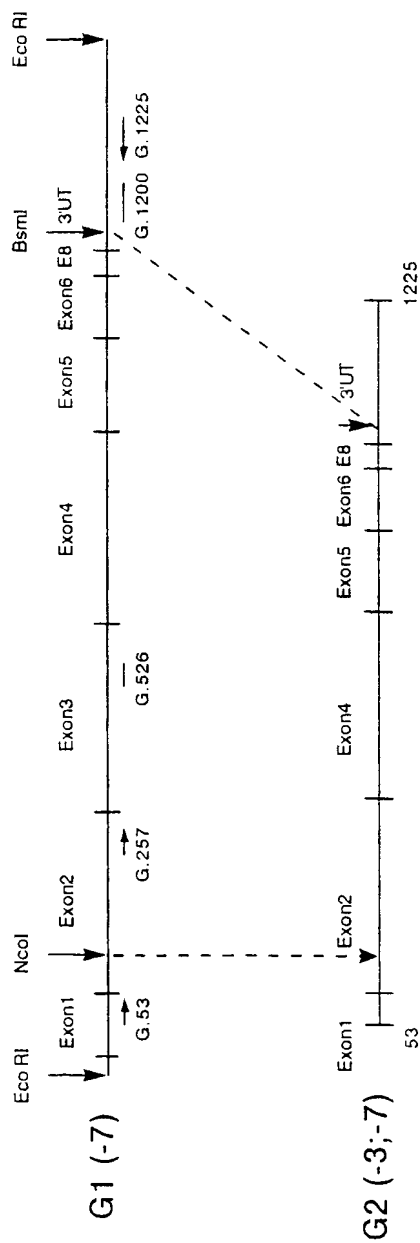


FIGURE 1

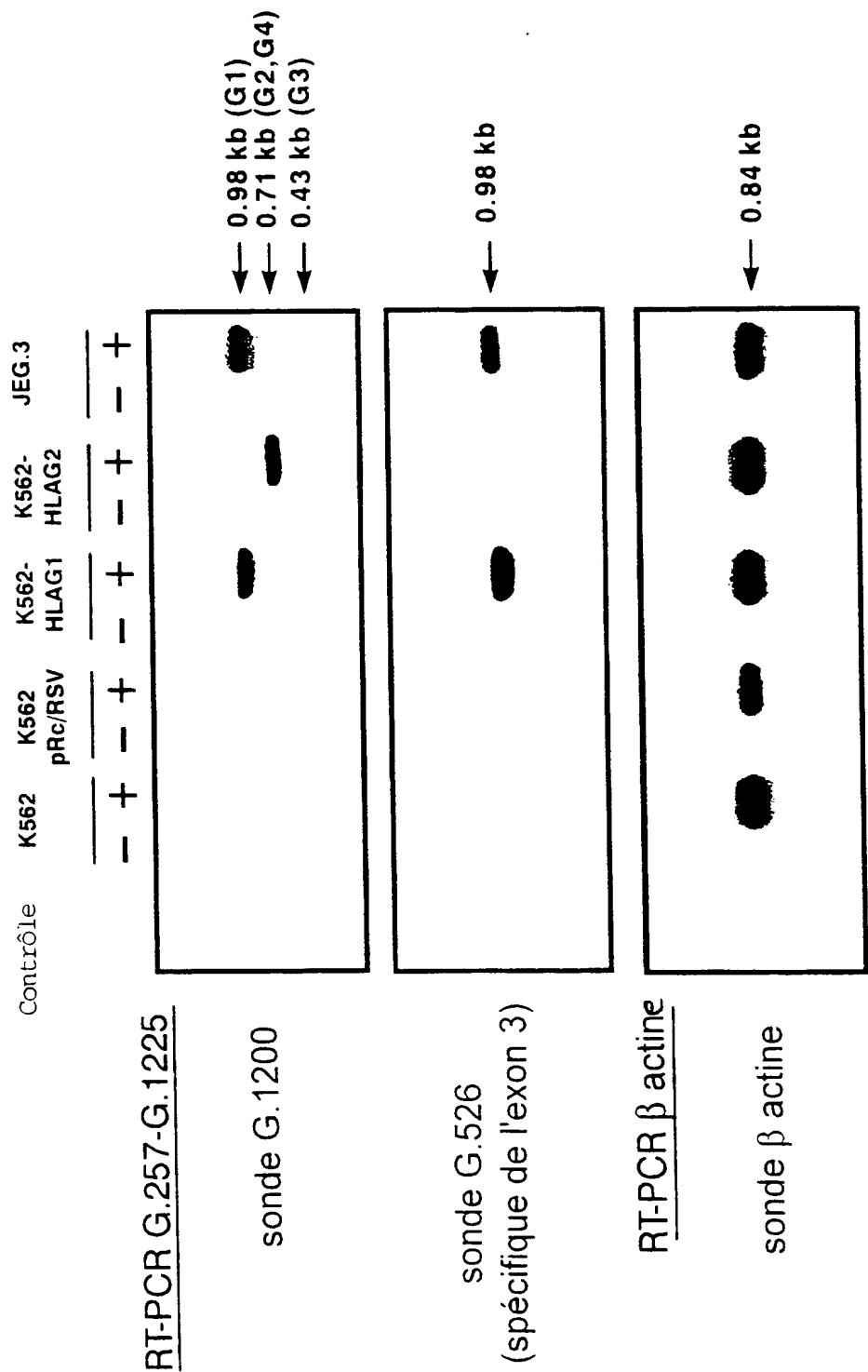


FIGURE 2

3/13

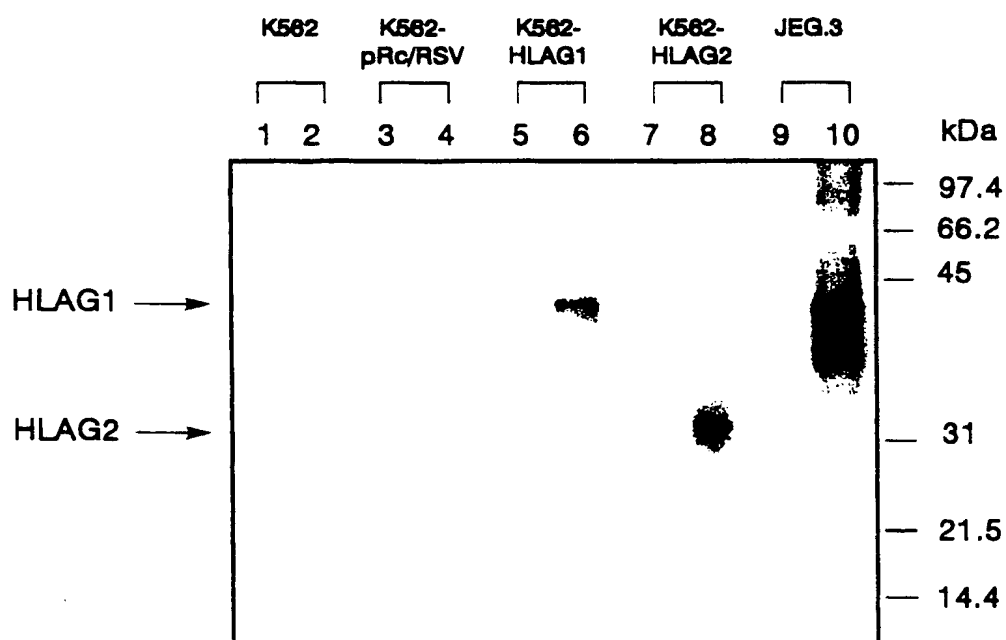


FIGURE 3

4/13

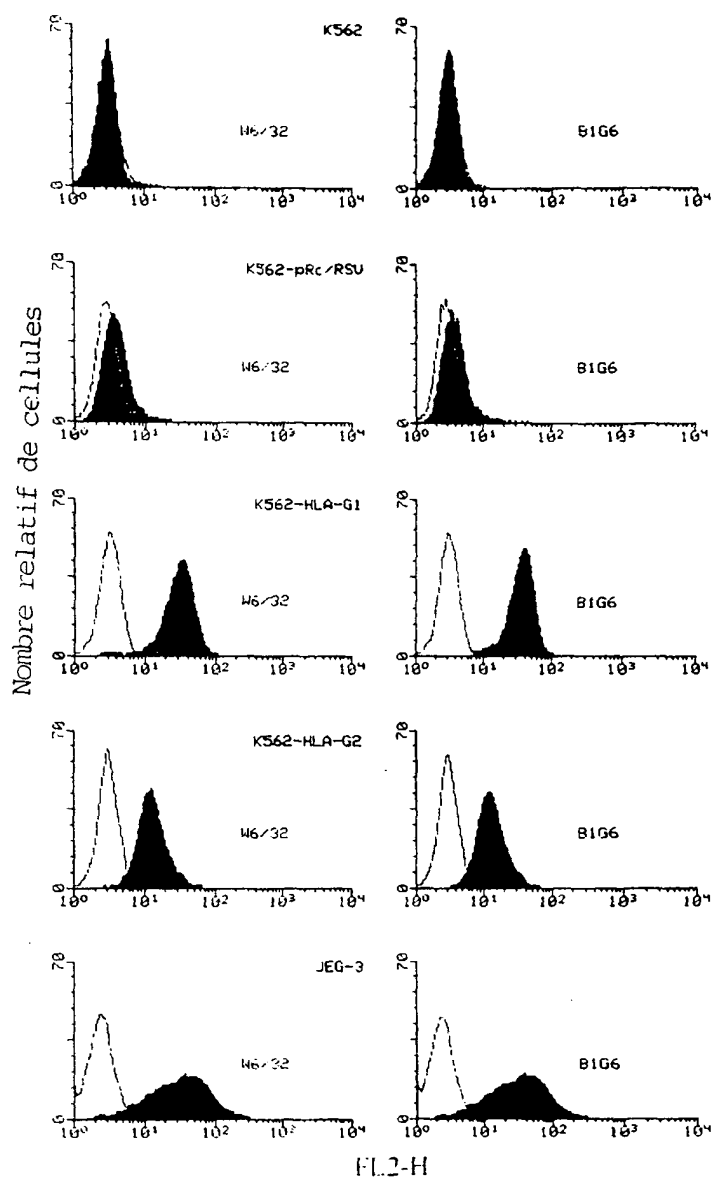
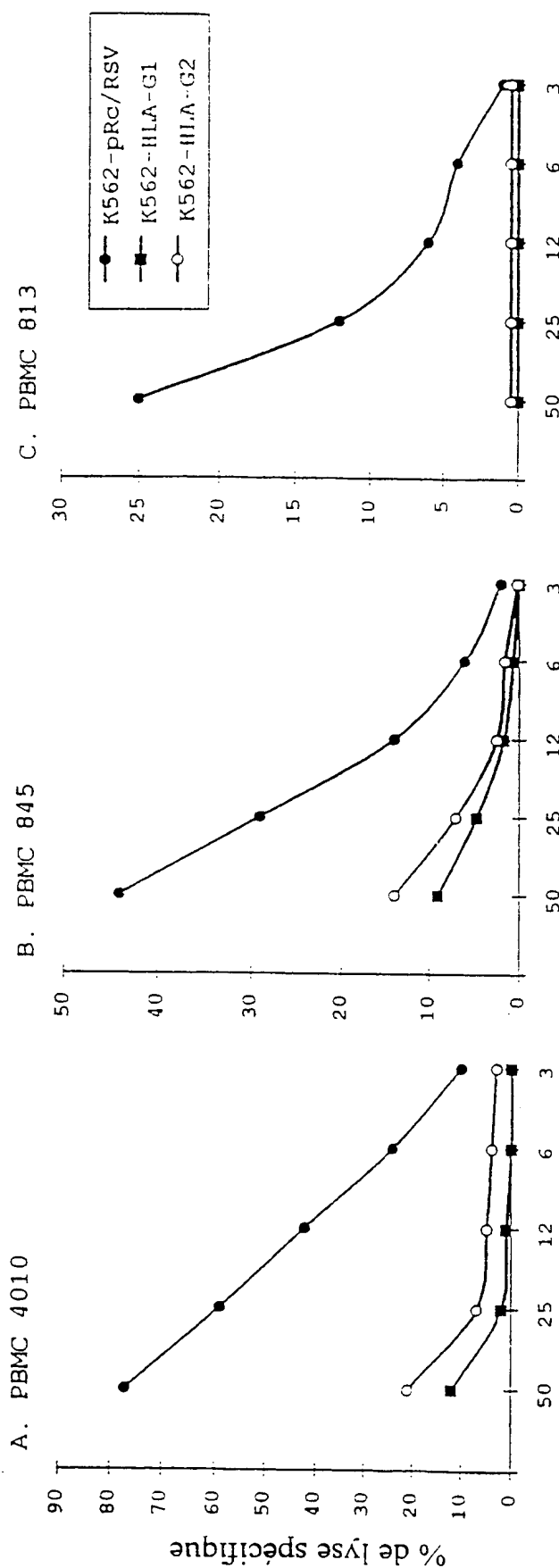


FIGURE 4

5/13



Rapport Effecteur : Cible

FIGURE 5

6/13

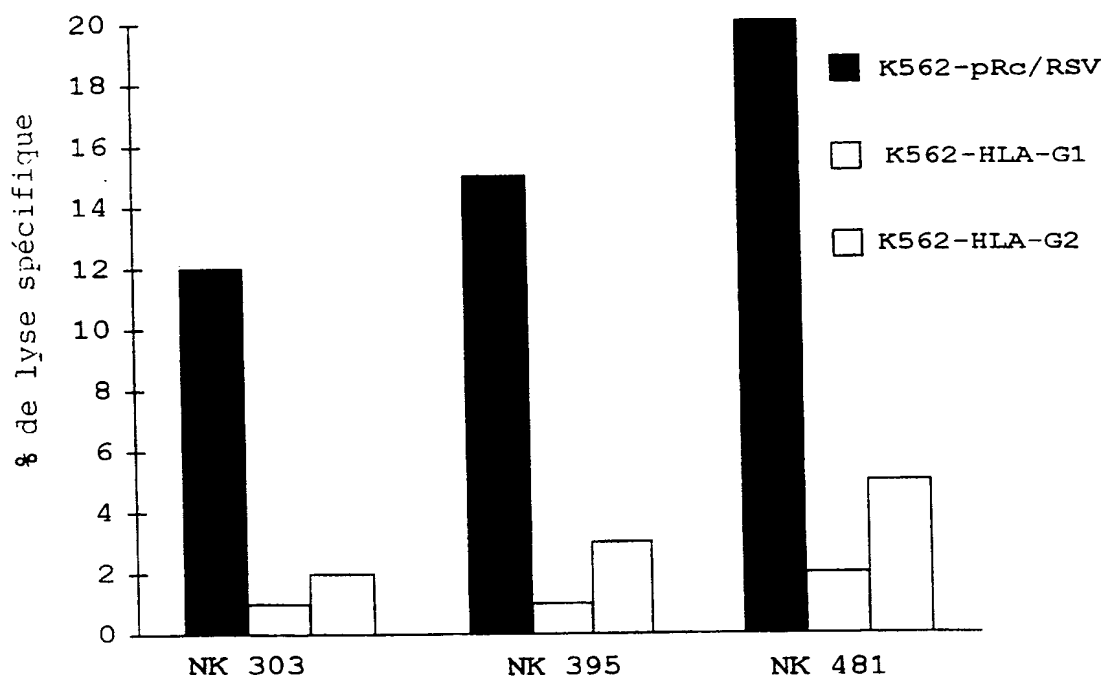
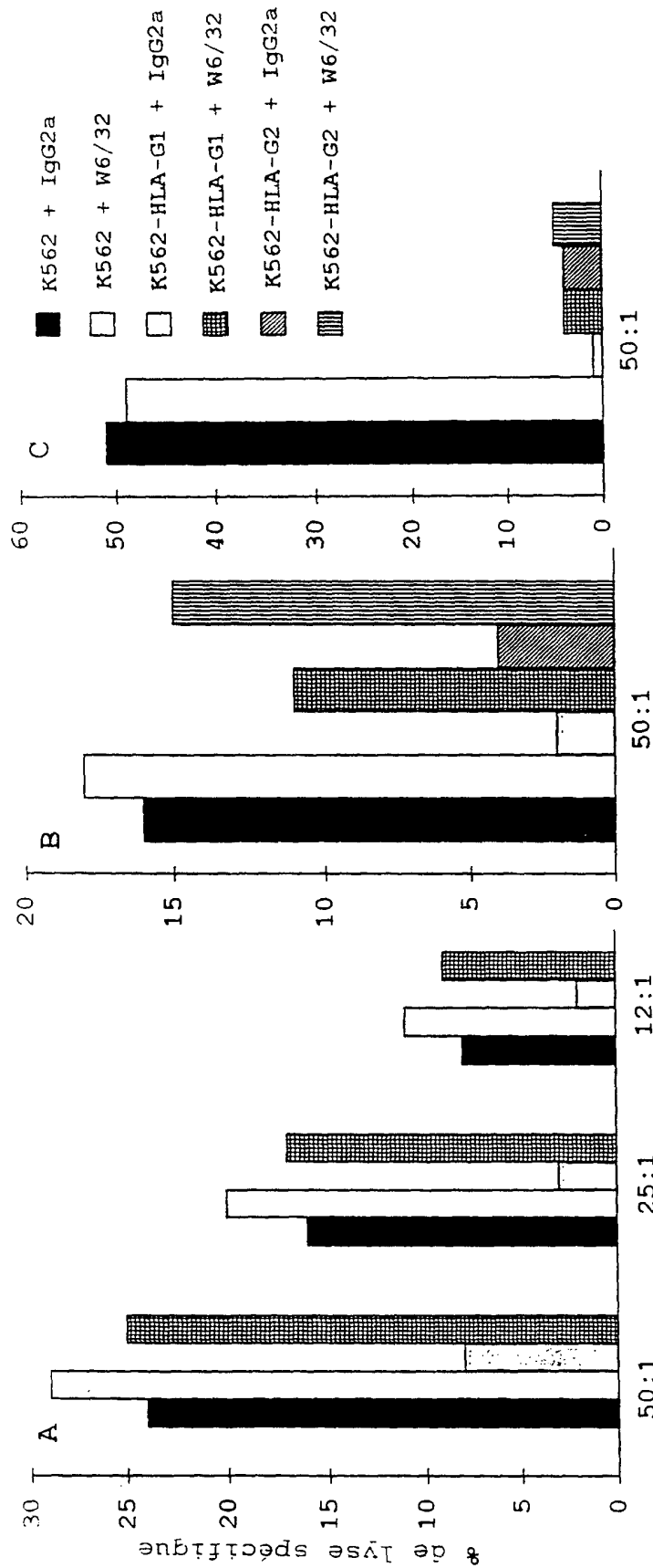


FIGURE 6



E:T

FIGURE 7

8/13

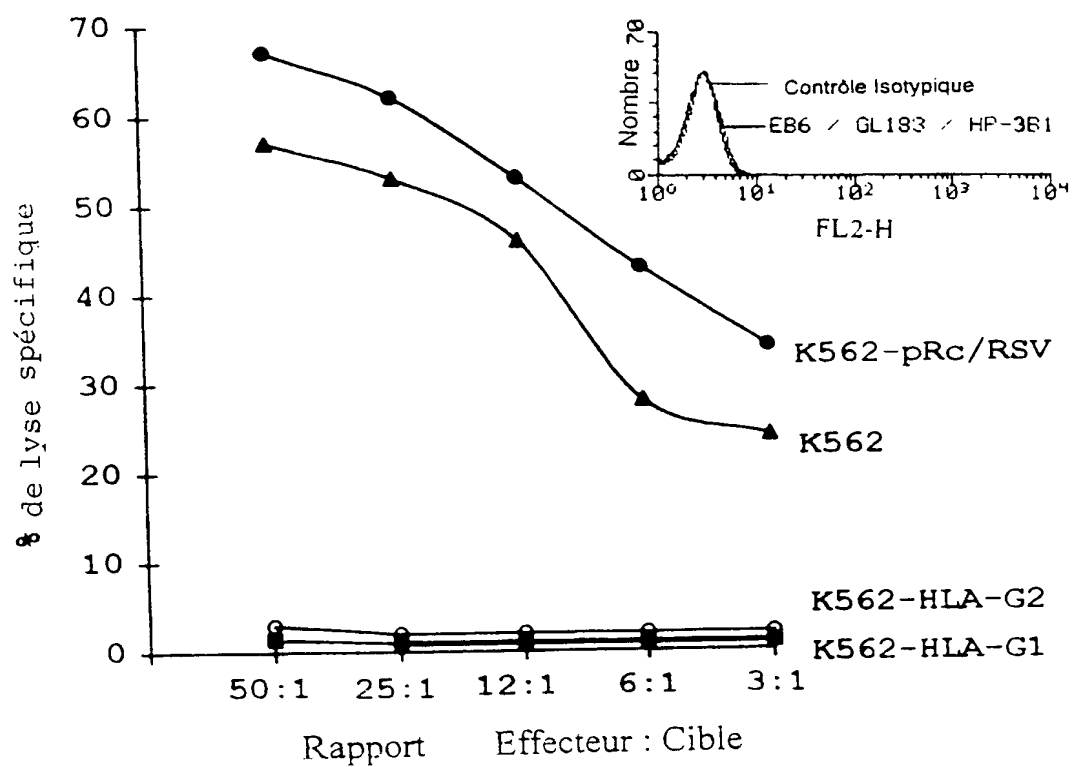


FIGURE 8

RÔLE DE LA MOLECULE HLA-G DANS LA REPONSE PROLIFERATIVE ALLOGENIQUE

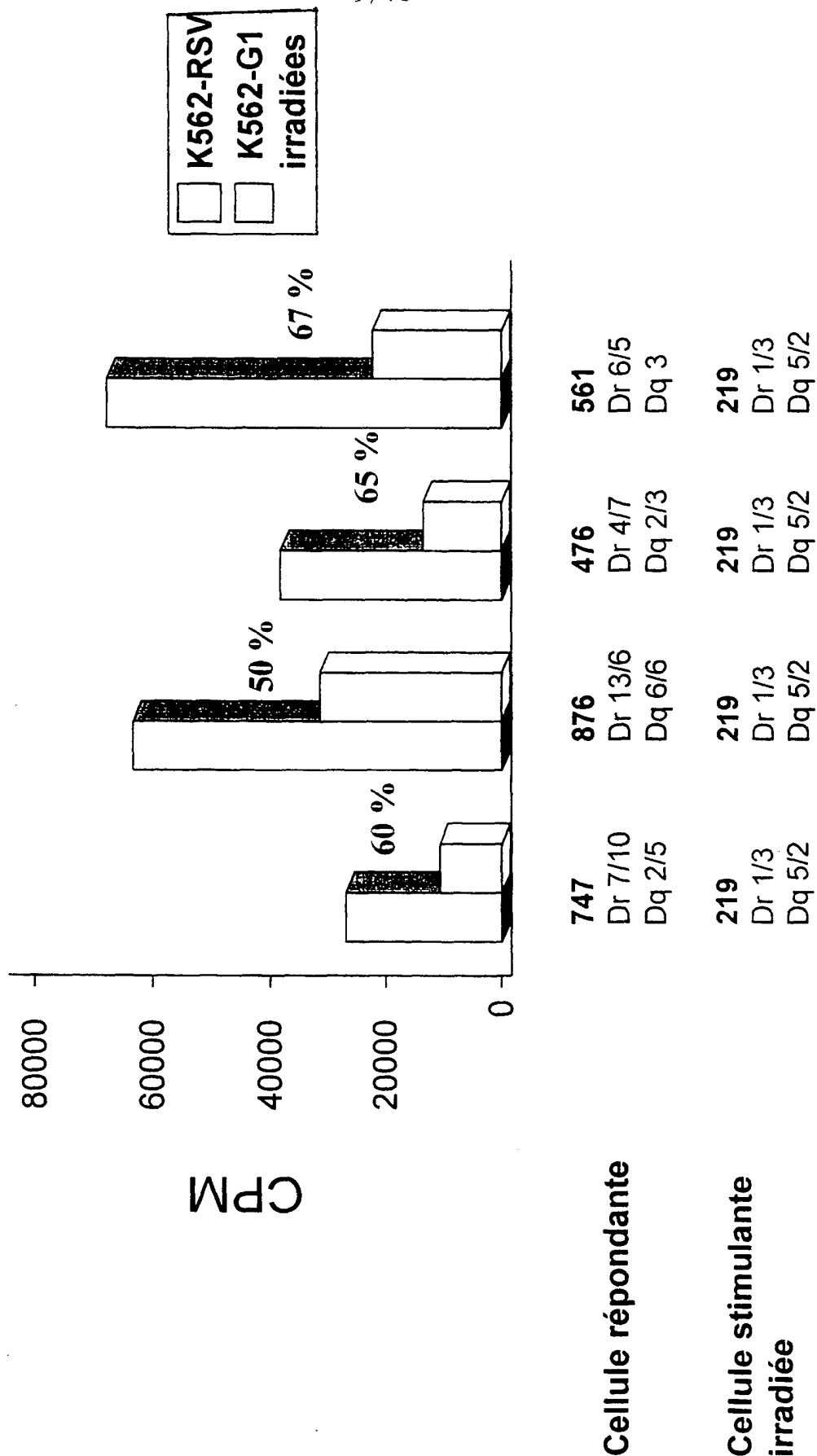


FIGURE 9

10/13

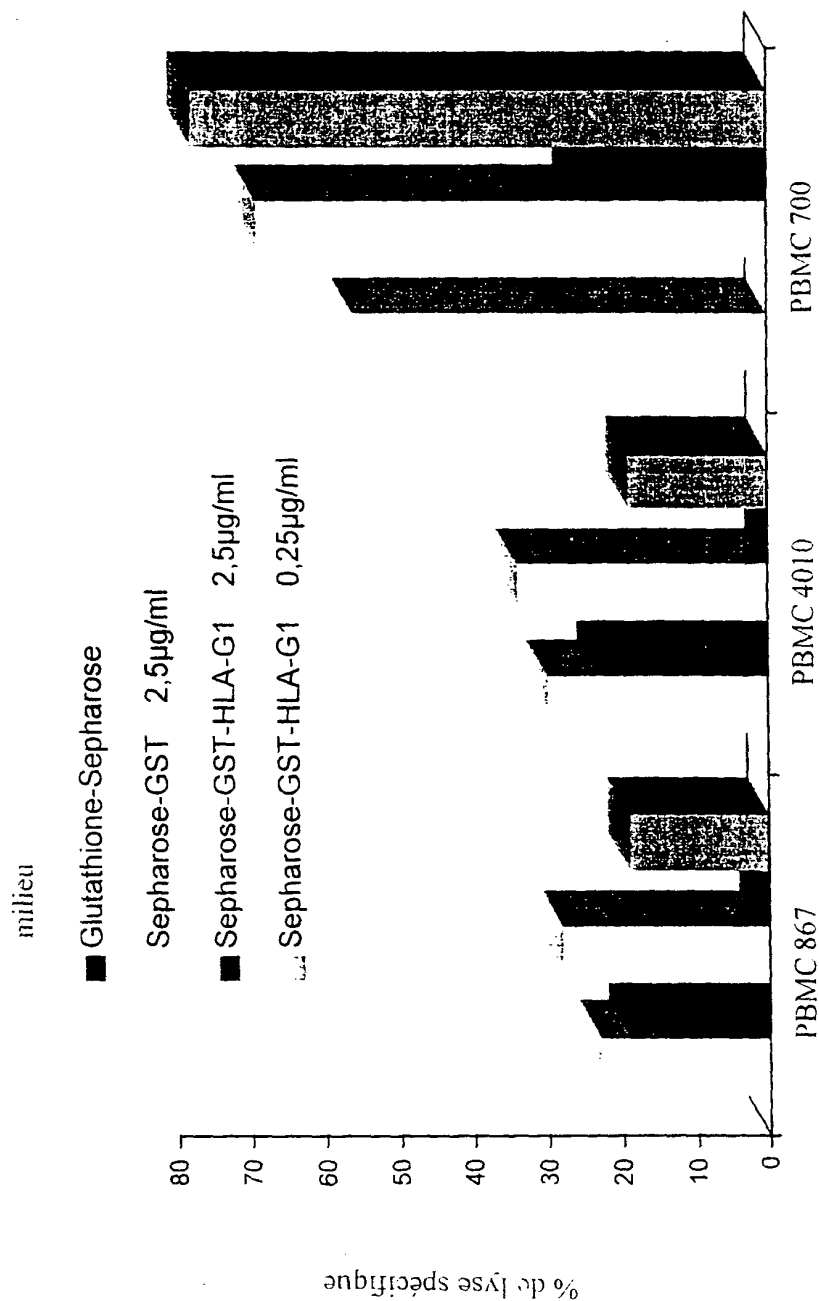


FIGURE 10

11/13

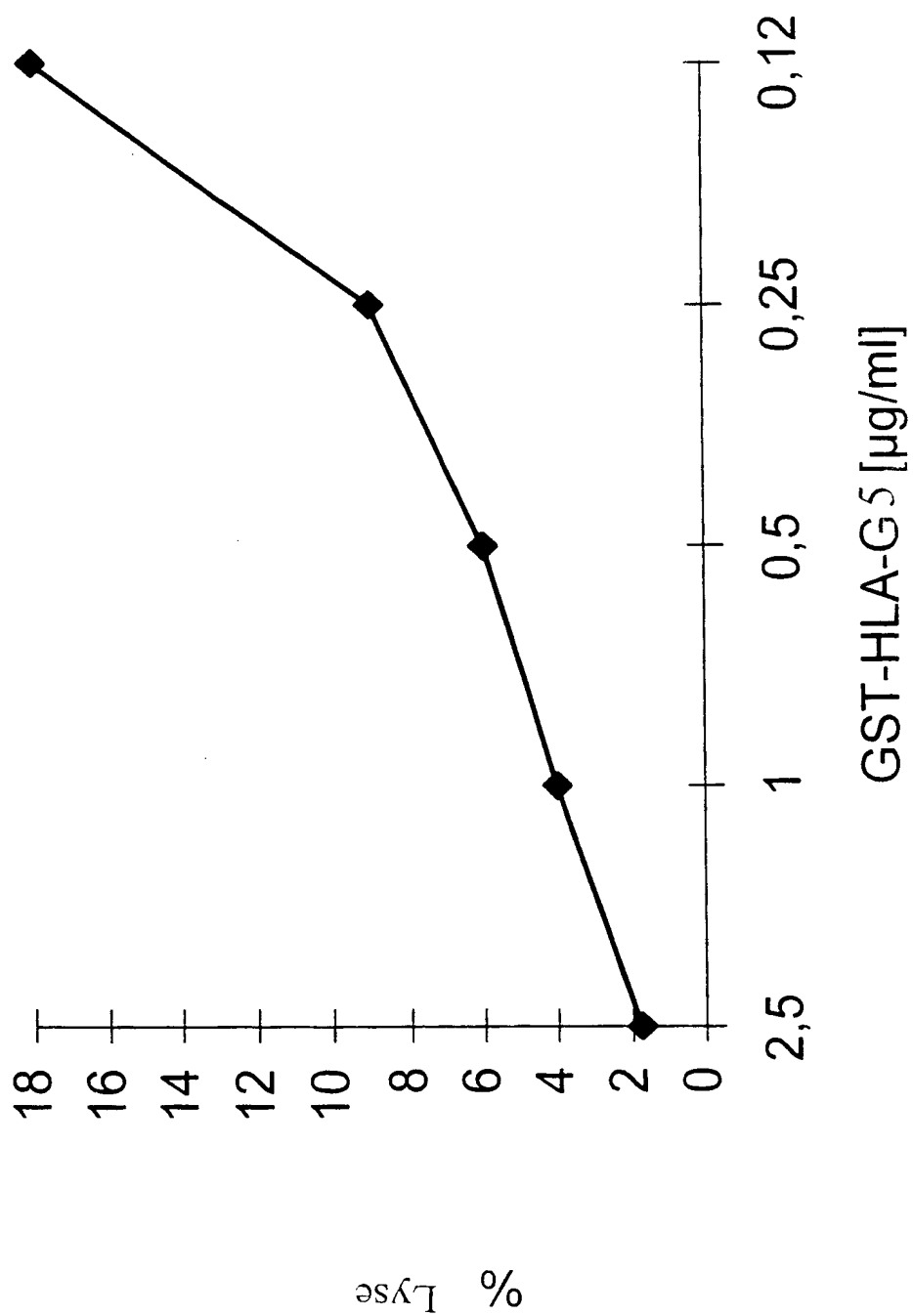
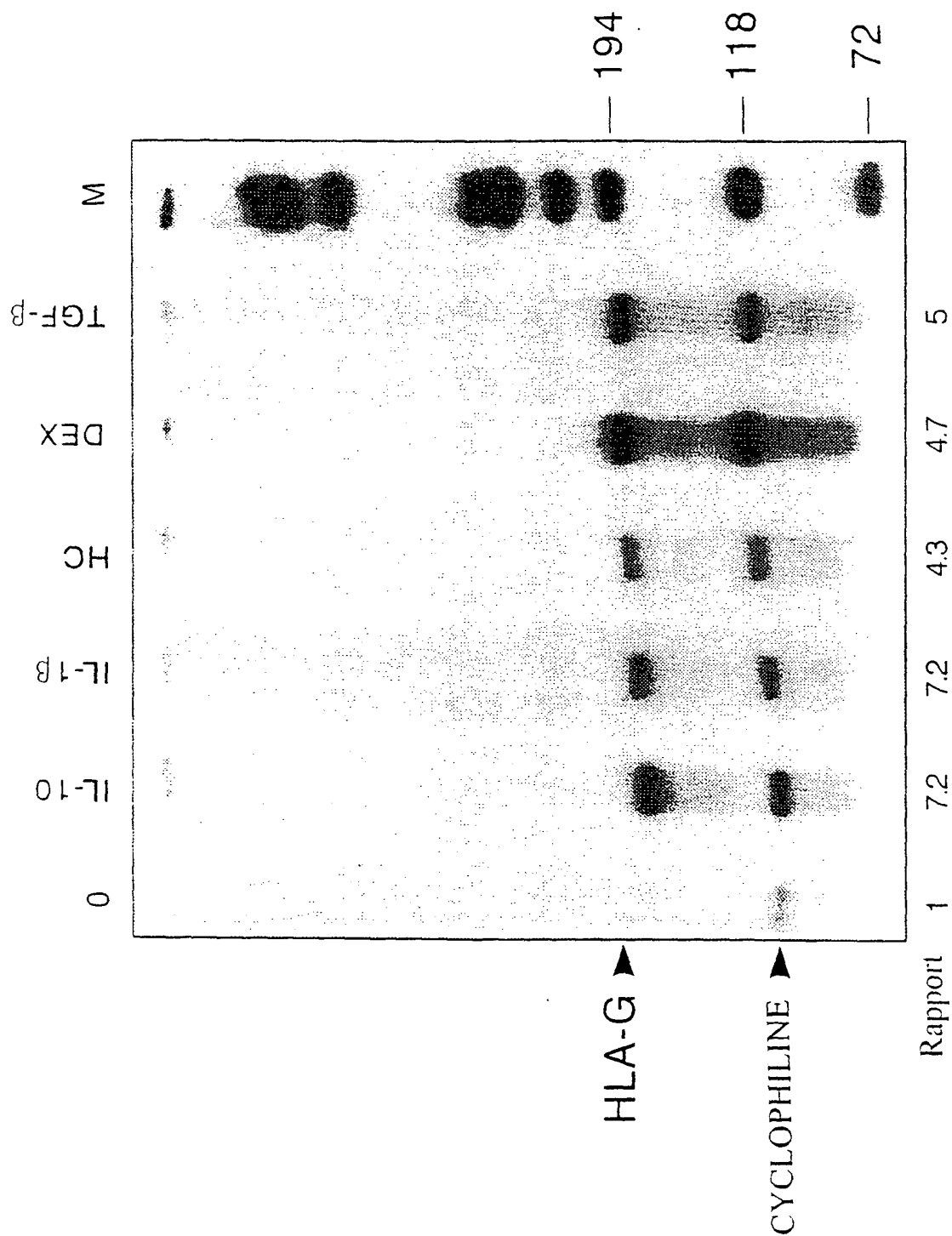


FIGURE 11

12/13



T151 (72h)

FIGURE 12

FIGURE 13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/00333

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K14/705 C12N5/10 C12N15/86 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 06241 A (GEN HOSPITAL CORPORATION) 20 February 1997 see the whole document	1, 2, 5-8, 10-16
X	C.M. SCHMIDT ET AL.,: "Extraembryonic expression of the human MHC class I gene HLA-G in transgenic mice. Evidence for a positive regulatory region located 1 kilobase 5' to the start site of transcription" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 151, no. 5, 1993, BETHESDA, MD, US, pages 2633-2645, XP002047493 see the whole document	7, 8, 12, 14, 16



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 June 1998

Date of mailing of the international search report

10/07/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mateo Rosell, A.M.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/00333

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 95 31472 A (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS) 23 November 1995</p> <p>see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>1,2,5,7, 9,10, 12-14,16</p>
A	<p>FR 2 717 498 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 22 September 1995</p> <p>see the whole document</p> <p>& EP 0 677 582 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE)</p> <p>cited in the application</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>1,5,10, 12,14</p>
A	<p>P. MOREAU ET AL.: "Soluble HLA-G molecule. An alternatively spliced HLA-G mRNA form candidate to encode it in peripheral blood mononuclear cells and human trophoblasts"</p> <p>HUMAN IMMUNOLOGY, vol. 43, 1995, NEW YORK, NY, US, pages 231-236, XP002046234</p> <p>cited in the application</p> <p>see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>1,2,5,6, 11,14,16</p>
A	<p>L. PAZMANY ET AL.: "Protection from natural killer cell-mediated lysis by HLA-G expression on target cells"</p> <p>SCIENCE, vol. 274, 1996, WASHINGTON DC, US, pages 792-795, XP002046235</p> <p>cited in the application</p> <p>see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>1,2,5, 12-14</p>
A	<p>WO 96 31604 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 10 October 1996</p> <p>see abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>10</p>
A	<p>E.D. CAROSELLA ET AL.: "HLA-G revisited"</p> <p>IMMUNOLOGY TODAY, vol. 17, no. 9, 1996, AMSTERDAM, NL, pages 407-409, XP004034736</p> <p>cited in the application</p> <p>see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>1,2,5-8, 12-16</p>
A	<p>WO 97 00085 A (UNIV MEDICINE & DENTISTRY OF N) 3 January 1997</p> <p>see abstract; claims 1-37</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>3,4,11</p>
-/--		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/00333

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>N.J.G. WEBSTER ET AL., : "The hormone-binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function"</p> <p>CELL, vol. 54, 15 July 1988, CAMBRIDGE, MASS, US, pages 199-207, XP002069634 see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	3,4
P,X	<p>N. ROUAS-FREISS ET AL.: "The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: Is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors?"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 94, 1 May 1997, WASHINGTON DC, US, pages 5249-5254, XP002046238 see the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,2,5,9, 10,12-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/00333

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9706241	A	20-02-1997	AU 6687696 A EP 0842266 A	05-03-1997 20-05-1998
WO 9531472	A	23-11-1995	AU 688914 B AU 2513395 A CA 2190576 A EP 0759930 A JP 10501690 T	19-03-1998 05-12-1995 23-11-1995 05-03-1997 17-02-1998
FR 2717498	A	22-09-1995	EP 0677582 A	18-10-1995
WO 9631604	A	10-10-1996	AU 5256896 A CA 2213620 A EP 0819171 A	23-10-1996 10-10-1996 21-01-1998
WO 9700085	A	03-01-1997	AU 6282896 A EP 0835130 A	15-01-1997 15-04-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

de Internationale No

PCT/FR 98/00333

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C07K14/705 C12N5/10 C12N15/86 A61K48/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 97 06241 A (GEN HOSPITAL CORPORATION) 20 février 1997 voir le document en entier ---	1, 2, 5-8, 10-16
X	C.M. SCHMIDT ET AL.,: "Extraembryonic expression of the human MHC class I gene HLA-G in transgenic mice. Evidence for a positive regulatory region located 1 kilobase 5' to the start site of transcription" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 151, no. 5, 1993, BETHESDA, MD, US, pages 2633-2645, XP002047493 voir le document en entier --- -/--	7, 8, 12, 14, 16



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

29 juin 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

10/07/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mateo Rosell, A.M.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D de Internationale No

PCT/FR 98/00333

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 95 31472 A (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS) 23 novembre 1995 voir le document en entier ---	1,2,5,7, 9,10, 12-14,16
A	FR 2 717 498 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 22 septembre 1995 voir le document en entier & EP 0 677 582 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) cité dans la demande ---	1,5,10, 12,14
A	P. MOREAU ET AL.,: "Soluble HLA-G molecule. An alternatively spliced HLA-G mRNA form candidate to encode it in peripheral blood mononuclear cells and human trophoblasts" HUMAN IMMUNOLOGY, vol. 43, 1995, NEW YORK, NY, US, pages 231-236, XP002046234 cité dans la demande voir le document en entier ---	1,2,5,6, 11,14,16
A	L. PAZMANY ET AL.,: "Protection from natural killer cell-mediated lysis by HLA-G expression on target cells" SCIENCE, vol. 274, 1996, WASHINGTON DC, US, pages 792-795, XP002046235 cité dans la demande voir le document en entier ---	1,2,5, 12-14
A	WO 96 31604 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 10 octobre 1996 voir abrégé ---	10
A	E.D. CAROSELLA ET AL.: "HLA-G revisited" IMMUNOLOGY TODAY, vol. 17, no. 9, 1996, AMSTERDAM, NL, pages 407-409, XP004034736 cité dans la demande voir le document en entier ---	1,2,5-8, 12-16
A	WO 97 00085 A (UNIV MEDICINE & DENTISTRY OF N) 3 janvier 1997 voir abrégé; revendications 1-37 ---	3,4,11

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

nde Internationale No

PCT/FR 98/00333

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	N.J.G. WEBSTER ET AL., : "The hormone-binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function" CELL, vol. 54, 15 juillet 1988, CAMBRIDGE, MASS, US, pages 199-207, XP002069634 voir le document en entier ---	3,4
P,X	N. ROUAS-FREISS ET AL.: "The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: Is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors?" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 94, 1 mai 1997, WASHINGTON DC, US, pages 5249-5254, XP002046238 voir le document en entier -----	1,2,5,9, 10,12-16

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Classe Internationale No

PCT/FR 98/00333

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 9706241	A	20-02-1997	AU 6687696	A	05-03-1997
			EP 0842266	A	20-05-1998
WO 9531472	A	23-11-1995	AU 688914	B	19-03-1998
			AU 2513395	A	05-12-1995
			CA 2190576	A	23-11-1995
			EP 0759930	A	05-03-1997
			JP 10501690	T	17-02-1998
FR 2717498	A	22-09-1995	EP 0677582	A	18-10-1995
WO 9631604	A	10-10-1996	AU 5256896	A	23-10-1996
			CA 2213620	A	10-10-1996
			EP 0819171	A	21-01-1998
WO 9700085	A	03-01-1997	AU 6282896	A	15-01-1997
			EP 0835130	A	15-04-1998

